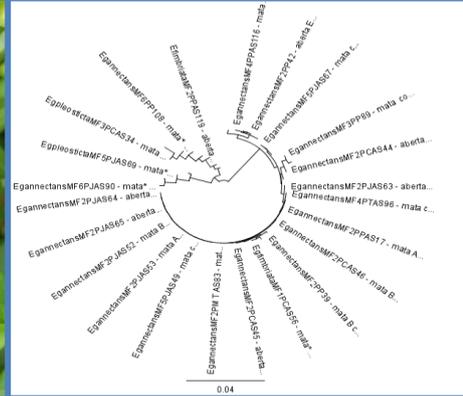
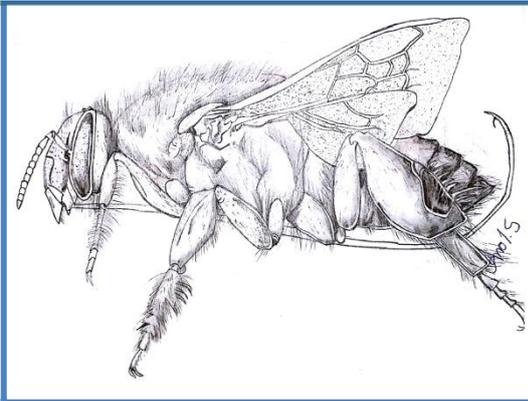
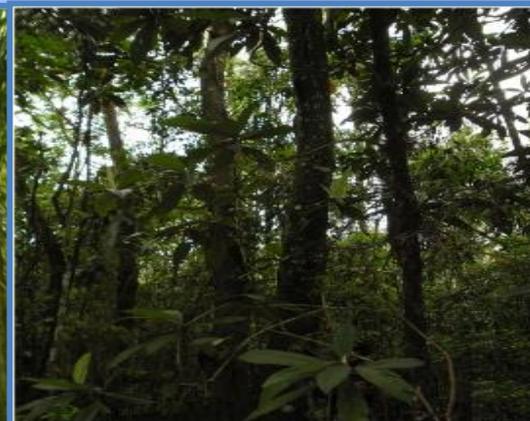
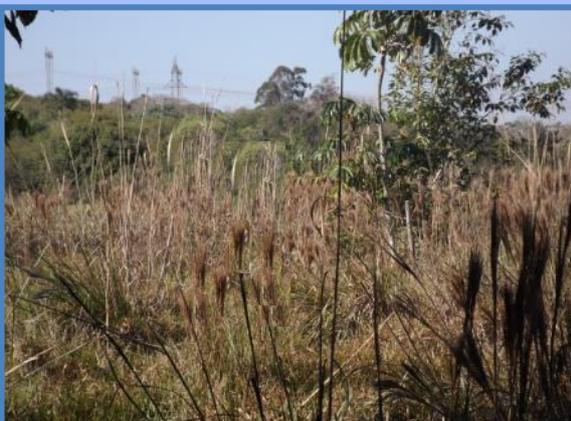


Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - FCBA
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade - PPGECEB



**Influência da regeneração florestal na comunidade de abelhas da
Mata Atlântica e Cerrado, Brasil**

M.^a ANA ISABEL SOBREIRO



Dourados - MS
Setembro, 2018

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

M.^a ANA ISABEL SOBREIRO

Influência da regeneração florestal na comunidade de abelhas da Mata Atlântica e Cerrado, Brasil

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTOR EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE.

Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação

Orientador: Prof. Dr. Valter Vieira Alves Junior
Co-orientador: Dr. Jesús Gómez-Zurita – Cap. 3
Co-orientadora: Dra. Rosilda Mara Mussury – Cap. 2
Co-orientador: Prof. Dr. Samuel V. Boff – Cap. 1

Dourados-MS
Setembro, 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S677i Sobreiro, Ana Isabel
Influência da regeneração florestal na comunidade de abelhas da Mata Atlântica e Cerrado, Brasil / Ana Isabel Sobreiro. –2018.
104 f. il. algumas color.

Orientador: Valter Vieira Alves Junior
Co-orientadores: Jesús Gómez-Zurita, R. Mara Mussury e Samuel V. Boff
Tese (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade)–
Universidade Federal da Grande Dourados, 2018.

1. Abelhas – Cerrado (Brasil). 2. Polinização. 3. Floresta – Brasil (Centro-Sul). I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com dados fornecidos pelo autor

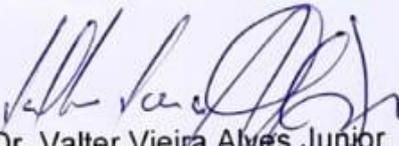
©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

INFLUÊNCIA DA REGENERAÇÃO FLORESTAL NA COMUNIDADE DE
ABELHAS DA MATA ATLÂNTICA, BRASIL”

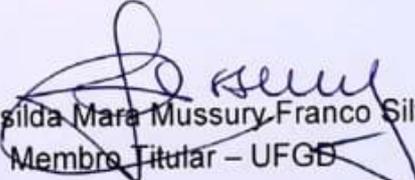
Por

ANA ISABEL SOBREIRO

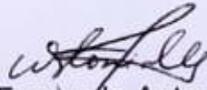
Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTORA EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação



Dr. Valter Vieira Alves Junior
Orientador/Presidente – UFGD



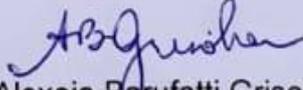
Dr.ª Rosilda Mara Mussury Franco Silva
Membro Titular – UFGD



Dr. William Fernando Antonialli Junior
Membro Titular – UEMS



Dr. José Benedito Perrella Balestieri
Membro Titular – UFGD



Dr.ª Alexeia Barufatti Grisolia
Membro Titular – UFGD

Aprovada em: 13 de setembro de 2018.

Biografia do Acadêmico

Aproveito este espaço para descrever parte da minha trajetória com pesquisas acadêmicas e o ingresso na linha de taxonomia, ecologia e genética de abelhas. Aqui também descrevo sobre as oportunidades que surgiram e as dificuldades encontradas nesta trajetória entre mestrado (dois anos) e doutorado (três anos e meio). Nascida em Céu Azul no oeste do Estado do Paraná, filha de Gamaliel Alves Sobreiro (falecido 23/12/2015) e Miria Furlanetto Sobreiro, vivi por 17 anos em um sítio no município de Vera Cruz do Oeste-PR. Neste ambiente foram adquiridos meus primeiros conhecimentos sobre a natureza e a biodiversidade, despertando o amor pela vida e proteção à mesma. Cursei o Ensino Fundamental na Escola Municipal Vital Brasil, e o Ensino Médio no Colégio Estadual Marquês de Paranaguá, ambos no município de residência (Vera Cruz do Oeste). Os primeiros contatos que tive com abelhas foram com a comunidade local, onde existem vários apicultores e meliponicultores, inclusive meu nono (avô materno) era um apicultor. Então, despertei o interesse pelo curso superior de Ciências Biológicas e no ano de 2009 passei no vestibular na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) no Estado do Mato Grosso do Sul. Durante o curso de graduação realizei vários projetos de ensino, pesquisa e extensão. Logo após ingressar no curso (com quatro meses de matrícula) reconheci pelos corredores na Faculdade de Ciências Biológicas (FCBA/UFGD) um professor que foi um das minhas inspirações para cursar Ciências Biológicas, o Dr. Fabiano Antunes. Iniciamos um projeto de pesquisa na linha de Ensino e Aprendizagem, no qual recebi o primeiro incentivo financeiro (bolsista PROLICEN). No segundo ano de graduação ingressei no Programa de Educação Tutorial (PET-Bio) coordenado pela professora Dra. Rosilda Mara Mussury. Então passei de bolsista do PROLICEN para voluntária, e agora bolsista do PET-Bio, permanecendo no mesmo pelos próximos três anos. Durante a graduação executei projetos de ensino e extensão vinculados ao PET-Bio, pesquisa na linha de Ensino e Aprendizagem e Produção de Horticultura orientada pela professora Dra. Andreia Sangalli (desenvolvendo o TCC), também realizei projetos de extensão vinculados ao BIOEDUCANDO coordenado pela professora Dra. Juliana Carrijo-Mauad. Em quatro anos me formei em licenciatura e bacharelado em Ciências Biológicas. Em Janeiro de 2013 ingressei no mestrado no Programa de Pós-graduação em Bioprospecção e Biodiversidade da FCBA/UFGD, no qual realizei pesquisa na linha de Produção e Horticultura sob orientação do professor Dr. Néstor Antônio Heredia Zarate, e desenvolvi minha dissertação sobre a Diversidade de Abelhas orientada pelo professor Dr. Valter Vieira Alves Junior. Em Março de 2015, iniciei o doutorado no Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, durante este período realizei pesquisa nas linhas de Diversidade e Ecologia de Abelhas, Taxonomia de Abelhas, Genética de População de Euglossini. Parte do doutorado realizei no Instituto de Biologia Evolutiva do Conselho Superior de Investigação Científica (CSIC) em Barcelona, Espanha e orientada pelo pesquisador Dr. Jesus Gómez-Zurita, na linha de pesquisa com genética de população de *Euglossa*. Esta etapa do doutorado durou seis (6) meses e foi um dos períodos da minha vida que desfrutei as melhores experiências e conhecimentos profissional e pessoal. Foram seis meses de intensos trabalhos em laboratório, muita leitura, muitas informações novas e a desconstrução do conhecimento prévio e equivocado para a construção do novo e correto “saber científico”, e com certeza, foram os meses mais batalhadores e os mais proveitosos em termos científicos. Não foram os melhores pelas intensas atividades em laboratório, mas sim pela técnica de ensino, pela prática e especialmente pela troca de experiências com pesquisadores com um amplo conhecimento sobre filogenética e evolução. Por fim, ao retornar ao Brasil, tive a oportunidade de cursar duas disciplinas na Universidade Federal de Lavras, onde também realizei os últimos levantamentos de dados morfológicos das populações de *Euglossa*, e iniciando agora uma nova trajetória profissional.

Agradecimentos

Á Deus, porque foi por meio de sua proteção e fortalecimento que consegui enfrentar todos os obstáculos neste período e, além disso, trouxe a minha vida pessoas especiais que contribuíram com conhecimento ou lições para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu esposo, Lucas, por sua demonstração de amor e paciência que nesta etapa da minha vida, por sua ajuda nas correções, com a redação científica e nas coletas, obrigado por toda a dedicação e clama comigo amor.

A memória do meu pai, Gamaliel, uma perda inestimável e uma lição dos momentos que não devem ser perdidos por nada. A minha mãe, Miria, por me apoiar, ajudar nas coletas de campo e por ser forte para manter nossa família unida. Aos meus irmãos, Diego e Lais, por acreditarem em mim, por ajudarem nas coletas de campo e me fortalecerem nesta etapa.

Ao pesquisador Dr. Jesus Gomez-Zurita do Instituto de Biologia Evolutiva (CSIC-UPF) por aceitar-me co-orientar no exterior sobre uma linha de pesquisa pouco conhecida para mim (no Capítulo 3 desta tese). Muito obrigado por ceder seu laboratório às coletas moleculares e análises dos dados, e por todas as dúvidas pacientemente esclarecidas. Muito do conhecimento científico e do caráter profissional de respeito ao próximo (independente da classe) que hoje eu construí foi ele quem me ensinou, obrigado. A sua admirável esposa, Anabela, técnica e pesquisadora assistente do laboratório de Evolução de Besouros Herbívoros, por me ensinar e ajudar na coleta dos dados moleculares, por sua paciência e sabedoria ao me ensinar, por sua amizade e por falar português, muito obrigado Anabela.

Ao professor Dr. Valter Vieira Alves Junior, meu orientador, por me apoiar nas minhas decisões e me incentivar a ser uma profissional que escolhe os próprios caminhos. Pelos “puxões de orelha” nos momentos que o sistema governamental das universidades que nos deixam perplexos com tanta injustiça. A paixão pelas abelhas foi transmitida pelo Valter, e foi isto que me levou a busca do conhecimento em várias linhas de pesquisa do grupo: taxonomia, ecologia, diversidade, genética e comportamento de abelhas, obrigado chefe!

A professora Dra. Rosilda Mara Mussury, minha orientadora na graduação e co-orientadora na tese (no Capítulo 2 desta tese) pela parceria nas pesquisas, apoio na escrita científica e publicações. Em especial, pela amizade e conselhos preciosíssimos para carreira profissional e vida pessoal.

Ao professor Dr. Samuel Vieira Boff, meu co-orientador (no Capítulo 1 desta tese), pelas dicas científicas, pela ajuda na redação científica, pelo esclarecimento em dúvidas sobre genética do grupo Euglossini, pelas críticas e “brincas”, pois foram com os meus erros que

aprendi a ter pensamento crítico e me empenhar em novas descobertas. E também, por servir de inspiração para ser pesquisador no exterior, visto que é uma profissão não reconhecida no Brasil.

Aos professores Dr. Stephan Malfitano Carvalho e Dr. César Freire Carvalho por disponibilizarem o Laboratório de Abelhas (UFLA) para que eu realizasse as coletas de dados morfológicos, por seus conselhos e perspectivas inovadoras de docência na universidade. A Andrea (técnica do laboratório) pela gentileza e atendimento nas minhas solicitações de material.

Aos professores Dr. Alexandre dos Santos (IFMT), Dr. Josué Raizer e Dr. Yzel Rondon Suárez pelas inúmeras dúvidas esclarecidas sobre as análises estatísticas, e por seus ensinamentos sobre o uso do software R.

A professora Dra. Adelita Maria Linzmeier por atender meus questionamentos com disponibilidade e prontidão, e por contribuir com seu conhecimento para minha formação profissional e pessoal. Ao professor Dr. Rodrigo Barbosa Gonçalves pela identificação dos espécimes, por me receber em seu laboratório e me ensinar sobre taxonomia de abelhas. Ao professor Dr. Luiz Roberto Ribeiro Farias Junior pelas conversas sobre delineamento científico de projetos.

A minha amiga e colega de laboratório Jessica pela ajuda na separação do material e pelas produtivas conversas. Ao Vitor (secretário do PPGECB) pela eficiência e gentileza com que resolveu todos os meus problemas e solicitações junto ao programa da pós-graduação. E aos docentes da pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade por dividirem seu conhecimento.

Agradeço também as amigas que fiz no exterior, formando laços de amizade fortalecidos mesmo a distância. Aos meus colegas de laboratórios (Laboratório de Apicultura/UFGD, Laboratório de Abelhas/UFLA e Laboratório de Evolução/CSIC-Barcelona) pelas conversas e aprendizagens.

Muito obrigado a CAPES pela bolsa no Brasil e exterior, sem este incentivo com certeza não concluiria esta etapa. A UFGD pela disponibilidade do laboratório e material para pesquisa de campo. Ao CSIC por disponibilizarem material e equipamentos para a extração do DNA e pelo auxílio no exterior. Ao IBAMA pela permissão de transporte ao exterior concedida para a extração do DNA dos espécimes de Euglossina. Ao RBV – Itaipu Binacional por concederem material de pesquisa de campo, o veículo para coletas e o local de amostragem, além do auxílio nas coletas, em especial agradeço Veridiana Araújo Alves da

Costa Pereira, Rodolfo Rubik, Jorge Borges dos Santos, Edson Zanlorensi e Jarbas Aguinaldo Teixeira.

Ao Chico, gerente da Fazenda Ouro Fino, por facilitar a comunicação com o proprietário da RPPN e possibilitar as coletas.

Desculpe as pessoas que me ajudaram e os nomes não foram mencionados aqui, meu muito obrigado.

A todos o meu muito obrigado!

A minha família, em especial ao meu pai Gamaliel a maior lição que aprendi nestes três anos de doutorado! A Minha mãe Miria e irmãos (a) Emerson Diego e Lais Fernanda por serem minha fortaleza! Ao meu esposo Lucas que me ajudou e me apoiou neste sonho! Ao meu sogro Roberto, sogra Aliete, e cunhadas Luana e Tathiane pela assistência e incentivo! A minha tia Irez, tio Germano, prima Fernanda Maria e tia Ivone pelos ensinamentos e conselhos! Finalmente, a minha nona Ortenila e vó Izabel pelas orações e por serem minha inspiração como pessoa!

Amo muito vocês!

Dedico!

To be sure, it is not the fruits of scientific research that elevate a man and enrich his nature, but the urge to understand, the intellectual work, creative or receptive.

Albert Einstein, 1935 (The World As I See It)

Sumário

Lista de figuras	1
Lista de tabelas e apêndices	3
Lista de siglas/abreviaturas e conceitos	4
Resumo geral	5
General abstract	6
Introdução geral	7
Objetivo geral	14
Objetivos específicos	14
Capítulo 1: Abelhas das orquídeas associadas a microambientes contínuos beneficiam-se do remanescente florestal, Mata Atlântica, Paraná, Brasil	15
Resumo	16
Palavras-chave	16
Abstract	16
Keywords	16
Introdução	17
Materiais e métodos	19
<i>Área de estudo</i>	19
<i>Características dos sítios e complexidade do habitat</i>	20
<i>Amostragem</i>	21
<i>Análise dos dados</i>	22
Resultados	24
<i>O papel dos aromas</i>	28
Discussão	30
<i>O papel dos aromas</i>	33
Agradecimentos	34
Referências	35
Capítulo 2: Contribuição da regeneração florestal para disponibilidade sazonal e atividade de forrageamento de abelhas silvestres	44
Resumo	45
Palavras-chave	45
Abstract	45
Keywords	45
Introdução	46
Materiais e métodos	48
<i>Área de estudo</i>	48
<i>Características dos fragmentos florestais</i>	49
<i>Amostragem das abelhas</i>	51
<i>Análise estatística</i>	52
Resultados	54
<i>Abundância e diversidade de abelhas entre os tipos de florestas</i>	54
<i>Associação das abelhas e plantas entre os tipos de florestas</i>	56
<i>Determinantes ambientais e temporais da diversidade de abelhas</i>	57

<i>Influência de Apis mellifera sobre abelhas silvestres nos tipos de florestas</i>	59
Discussão	60
<i>Abundância e diversidade de abelhas entre os tipos de florestas</i>	60
<i>Associação das abelhas e plantas entre os tipos de florestas</i>	61
<i>Influência de Apis mellifera sobre abelhas silvestres nos tipos de florestas</i>	62
Agradecimentos	63
Referências	64
<i>Apêndice</i>	71
Capítulo 3: Análises das relações filogenéticas, filogeografia e especiação de <i>Euglossa annectans</i> (Hymenoptera, Euglossina)	73
Resumo	74
Palavras-chave	74
Abstract	74
Keywords	74
Introdução	75
Materiais e métodos	77
<i>Região de estudo e locais de amostragem</i>	77
<i>Características da fase florestal</i>	80
<i>Estratégia de amostragem</i>	81
<i>Características morfológicas</i>	81
<i>Extração do DNA e sequenciamento</i>	82
<i>Delineamento de espécies</i>	83
<i>Análises dos dados</i>	83
Resultados	84
<i>Relação filogenética</i>	84
<i>Características morfológicas</i>	89
Discussão	92
Agradecimentos	94
Referências	94
Considerações finais	99
Referências gerais	101

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Morfologia externa de abelhas (Hymenoptera: Apidae)..... 8
- Figura 2.** Morfologia e estrutura de abelhas na cabeça (A), área occipital e antenal (B), aparelho bucal (C), visão dorsal e frontal do tórax (D) e visão lateral e ventral do tórax (E)... 9
- Figura 3.** Ilustração das estruturas morfológicas externas de Euglossini..... 10
- Figura 4.** Tufo interno da tíbia média de espécies de *Euglossa*. A) Formatos do coxim de *Euglossa annectans*. B) Diferença no formato do coxim de espécies de *Euglossa*..... 11
- Figura 5.** Estrutura florestal, floresta madura ou primária (A) e floresta secundária em regeneração natural (B)..... 12
- Figura 6.** Localização dos fragmentos (floresta primária e secundária) e de cada sítio de amostragem utilizado no estudo para as comunidades de abelhas Euglossini no Estado do Paraná, Brasil. Floresta primária: sítios de amostragem (NA_P, NR_P e RE_P). Floresta secundária: sítios de amostragem (IN_S, IM_S e AD_S)..... 19
- Figura 7.** Armadilhas de isca feitas com garrafas plásticas comerciais de 2000 ml. (A) Bocal com arame para suportar a armadilha suspensa; (B) Pequenos frascos de vidro cheios de essência química e um pedaço de barbante que serviu como pavio para a dispersão da essência; (C) Duas aberturas laterais de diâmetro igual com abas para funcionar como “área de pouso” das abelhas; (D) Seis aberturas circulares para drenar o excesso de água; (E) Solução. Modificações do modelo de Campos et al. (1989)..... 22
- Figura 8.** Curva de rarefação (1000 aleatorizações) para a riqueza de espécies e indivíduos de abelhas das orquídeas em função de sua abundância nos seis sítios de floresta primária e secundária de Mata Atlântica no Estado do Paraná, Brasil..... 26
- Figura 9.** Histograma de distribuição temporal de abelhas Euglossini em fragmentos de Mata Atlântica primária e secundária no Estado do Paraná, Brasil. Outubro de 2013 a Setembro de 2014..... 27
- Figura 10.** Análise de Correspondência Destendenciada (DCA) da comunidade de Euglossini dos sítios (n = 6) nos fragmentos de floresta primária (NA_P, NR_P e RE_P) e secundária (IN_S, IM_S and AD_S) de Mata Atlântica no Estado do Paraná, Brasil. De acordo com os coeficientes de Sørensen-Dice..... 28
- Figura 11.** Frequência de machos de abelhas Euglossini capturados com diferentes armadilhas químicas (cineol, eugenol, salicilato de metila e vanilina) dentro dos fragmentos de Mata Atlântica primária e secundária no Estado do Paraná, Brasil. *Salicilato de metila..... 29
- Figura 12.** Área de estudo mostrando os dois fragmentos de Mata Atlântica (floresta madura e em regeneração) utilizados para amostragem da comunidade de abelhas silvestres, oeste do estado do Paraná, Brasil..... 49
- Figura 13.** Transecto de mil e quinhentos metros (1500 m) no limite de cada fragmento estudado (floresta madura e regenerada). Cada percurso de 3000 visitas de ida e volta foi visitado durante 12 horas de amostragem, totalizando 13500 metros percorridos (3 000 m x 4.5 visitados = 13500 m por dia) 52

- Figura 14.** Abundância total e riqueza de abelhas amostradas mensalmente em fragmentos de Mata Atlântica (floresta madura e regenerada), oeste do estado do Paraná, Brasil. De outubro de 2013 a setembro de 2014 55
- Figura 15.** Análise de componentes principais (PCA) das comunidades de abelhas em doze sítios de estudo. RF regeneração florestal e MF floresta madura de Mata Atlântica do oeste do estado do Paraná, Brasil. O eixo 1 representa a comunidade de abelhas e o eixo 2 representa os locais de amostragem..... 58
- Figura 16.** Diagrama de ordenação da Análise de Correspondência Canônica (CCA) com espécies de abelhas, seis variáveis abióticas e biótica (umidade, planta, precipitação, luminosidade, temperatura e vento) e duas variáveis temporais (hora e meses). O eixo 1 representa a comunidade de abelhas e o eixo 2 representa os fatores ambientais e temporais..... 59
- Figura 17.** Localização dos 10 fragmentos florestais e os sítios de amostragem usados neste estudo para a comunidade de *Euglossina*. Mapa inferior a esquerda mostra a área de ocorrência dos biomas Mata Atlântica e Cerrado. Quadrados verdes nas imagens de satélite mostram os fragmentos de floresta madura. Círculos vermelhos nas imagens de satélite mostram os fragmentos de floresta secundária. Sítios MS referem-se ao Mato Grosso do Sul. Sítios PR referem-se ao Paraná..... 79
- Figura 18.** Alinhamento das sequências genéticas com as posições variáveis observadas para os 13 haplótipos COI. Os pontos (.) indicam bases não variáveis conforme a sequência do haplótipo I, e as letras representam as variações para cada haplótipo. O “X” abaixo de cada posição indica a alteração do aminoácido traduzido. Observação: não estão representadas todas as variáveis nas bases e a alteração de aminoácidos, pois as sequências apresentavam tamanhos diferentes (ver Tabela 3), e foi utilizada como molde o haplótipo 1..... 85
- Figura 19.** Rede de haplotipos do gene COI para populações de *Euglossa*. Número de haplotipos representados na Tabela 2. Barras entre haplótipos representam conexões parcimoniosas. Círculos abertos (o) representam haplótipos intermediários que faltam na amostra. Caixas com cantos retos e linhas finas representam 1 passo na rede de haplótipos e 1 clado. Caixas com cantos arredondados e linhas finas representam 2 passos e com até 3 clados aninhados. Caixas com cantos retos e linhas grossas representam 3 passos com mais de 3 clados aninhados, exceto 3-3 que apresenta 2 clados e 3 passos..... 86
- Figura 20.** Consenso estrito de três clados e 98 passos mutacionais obtidos através da análise dos caracteres moleculares. Haplotipos obtidos na amostragem de *Euglossina* estão representados por cores. Grupos dentro do conchete () representa a distinção dos clados.. 88

LISTA DE TABELAS E APÊNDICES

Tabela 1. Gradiente ambiental: coordenadas geográficas, altitude (m), idade da vegetação (anos), tamanho dos locais (ha), estágio da floresta (Brasil, 1994) e locais de amostragem contínua da floresta primária e secundária, região oeste do Paraná sul do Brasil.....	20
Tabela 2. Espécies de abelhas das orquídeas atraídas com essências em microambientes contínuos de dois fragmentos florestais (primários e secundários) da Mata Atlântica, Brasil. Abundância total, Índice de diversidade (H'), dominância (D-1 e d) e Equitabilidade (J').....	25
Tabela 3. Gradiente ambiental: sítios amostrados, coordenadas geográficas, tamanho (m), altitude (m), estágio da floresta e características dos locais de amostragem em fragmentos de Mata Atlântica (floresta madura e regenerada), oeste do Paraná, Brasil.....	50
Table 4. Espécies vegetais nativas, naturalizadas e exóticas amostradas em fragmentos de Mata Atlântica (floresta madura e regenerada), oeste do Paraná, Brasil, de outubro de 2013 a setembro de 2014.....	57
Tabela 5. Gradientes ambientais: localização, coordenada geográfica, elevação (m), tamanho do fragmento (ha), fase florestal, classificação da vegetação, bioma e sítio de amostragem em dez fragmentos de floresta madura ou secundária no centro-sul do Brasil.....	78
Tabela 6. Distância geográfica entre fragmentos florestais para a população de <i>Euglossa</i> analisadas geneticamente no centro-sul, Brasil.....	78
Tabela 7. Sequências (<i>for</i> e <i>reverse</i>) de primers testados para a amplificação de fragmentos de mDNA do gene COI de <i>Eg. annectans</i> e as respectivas referências.....	82
Tabela 8. Rede de haplótipos analisados para a comunidade de Euglossina. Número de haplótipos, sítios de amostragem, taxa, tamanho do alelo (pb), essência atrativa e número de indivíduos para cada haplótipo obtido.....	84
Tabela 9. Análise de contingencia aninhada a variação genética e geográfica.....	87
Tabela 10. Matrix de Distâncias Patrística, divergência no número de substituições (μ) e tempo que ocorreu (t), calculada entre os haplótipos amostrados.....	87
Apêndice 1. Apêndice 1. Abelhas amostradas em seis locais de fragmentos de Mata Atlântica (floresta madura e em regeneração), oeste do estado do Paraná, Brasil.....	71

LISTA DE SIGLAS/ABREVIATURAS E CONCEITOS

RBV – Refúgio Biológico Bela Vista.

CISC – Conselho Superior de Investigação Científica (Barcelona, Espanha).

UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados.

IPF – Universidade Pompeu Fabra.

RPPN – Reserva Particular do Patrimônio Natural.

INs – Estágio Inicial de Regeneração.

IMs – Estágio Intermediário de Regeneração.

AVs – Estágio Avançado de Regeneração.

NAp – Floresta Nativa.

NRp – Floresta de Intersecção entre Nativa e Reflorestamento.

REp – Floresta Reflorestada.

FCBA – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais.

UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados.

MA – Mata Atlântica

MF 1 a 6 – Floresta Madura.

RF 1 a 6 – Floresta em Regeneração.

Abundância – número de indivíduos.

Riqueza – número de espécies.

Diversidade – expressão conjunta da riqueza de espécies e das proporções em que cada uma delas esta representada na comunidade. Razão entre riqueza e abundância.

Haplótipo – Cada variante de sequencia diferentes do conjunto de amostras.

Substituições sinonímicas – não alteram a conformação da proteína ou a parada prematura da síntese.

Substituições não sinonímicas – alteram a proteína ou a parada prematura da síntese.

Homoplasia – caracteres compartilhados entre duas ou mais espécies que não estavam presentes no ancestral comum, esta novidade teria surgido independente nas duas linhagens.

Sinapomorfia – caracteres compartilhados por um grupo. Indício de ancestralidade comum.

Autopomorfia – compartilhado por apenas uma taxa terminal de um determinado cladograma.

Resumo geral

Sobreiro, A.I. **Influência da regeneração florestal na comunidade de abelhas da Mata Atlântica, Brasil.** 2018. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS. As abelhas silvestres estão entre os agentes polinizadores mais importantes para a dispersão do pólen e manutenção das comunidades florais, devido especialmente às suas necessidades tróficas e agilidade do voo, rapidez com que visitam as flores e as estruturas morfológicas que facilitam os serviços ecossistêmicos. O fluxo gênico entre uma população de espécie de planta depende do alcance do polinizador, a região de ocorrência da espécie de planta e as características morfológicas da flor. Estas características da planta e polinizador favorecem as relações mutualísticas responsáveis pela preservação e manutenção dos sistemas florestais. Um número crescente de estudos indicam que as abelhas e outros polinizadores estão em declínio global, e dentre os principais distúrbios antrópicos que contribuem para isto, estão a fragmentação florestal, perda da diversidade floral e locais adequados para nidificação, compostos químicos (produtos fitossanitários) presentes nos recursos florais, degradação dos habitats e mudanças climáticas. Nesta perspectiva, este estudo teve como objetivo geral avaliar os efeitos da recuperação de florestas sobre a diversidade, morfologia e filogenia de abelhas silvestres em região de domínio da Floresta Atlântica e Cerrado no centro-sul do Brasil. A metodologia de coleta utilizada foi uso de redes entomológicas para coleta ativa de abelhas silvestres e iscas aromáticas para coleta passiva de Euglossini. O delineamento de amostragem foi composto de sítios de coleta distribuídos em fragmentos florestais maduros e secundários. Para avaliar a filogenética de Euglossini foi realizado extrações de DNA do gene COI por PCR. Neste estudo foram sequenciadas 50 amostras de *Euglossa* representando no total de 28.325 pares de bases. Os resultados obtidos revelam que a composição e diversidade de abelhas silvestres não diferem entre um contínuo de floresta madura e secundária, embora os fatores ambientais afetem a distribuição das comunidades de abelhas nestes ambientes. Os processos de recuperação de floresta podem favorecer as comunidades de abelhas, desde que estes fragmentos estejam próximos a remanescentes florestais. Os dados genéticos demonstraram que a diversidade genética variou para *Euglossa annectans*. Contudo, concluímos que o contínuo de floresta pode favorecer a reintegração das comunidades de abelhas e as variações polimórficas no DNA da população de *Euglossa annectans* e análise de contingência significativa corroboram para distinção evolutiva.

General abstract

Sobreiro, A.I. **Influence of forest regeneration on the bees community of the Atlantic Forest.** 2018. Thesis (Doctorate) - Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados-MS. Wild bees are among the most important pollinating agents for pollen dispersal and maintenance of flower communities, due in particular to their trophic needs and their offspring for their agility of flight, the speed with which they visit the flowers and the morphological structures that facilitate ecosystem services. Gene flow among a plant species population depends on the range of the pollinator, the region of occurrence of the plant species, and the morphological characteristics of the flower. These characteristics of the plant and pollinator favor the mutualistic relations responsible for the preservation and maintenance of forest systems. A growing number of studies indicate that bees and other pollinators are in global decline, and among the major anthropogenic disturbances that contribute to this are forest fragmentation, loss of floral diversity and adequate nesting sites, chemical compounds (sanitary products) present in floral resources, habitat degradation and climate change. In this perspective, the objective of this study was to understand the effects of forest recovery on the diversity, morphological and phylogenetic diversity of wild bees in a region of the Atlantic Forest in central-southern Brazil. The collection methodology used was the use of entomological networks for the active collection of wild bees and aromatic baits for passive collection of Euglossini. The sampling design was composed of collection sites distributed in mature and secondary forest fragments. The method of Euglossini phylogenetic analysis with mitochondrial DNA extractions by PCR was also used. In this study, 50 samples of *Euglossa* representing a total of 28,325 base pairs were sequenced. The results showed that the composition and diversity of wild bees do not differ between a continuum of mature and secondary forest, although environmental factors affect the distribution of bee communities in these environments. Forest recovery processes may favor bee communities, as long as these fragments are close to forest remnants. Genetic data have shown that genetic diversity varied for *Euglossa* annectans, to the extent that some specimens are not adequately grouped together. However, we conclude that the forest continuum may favor the reintegration of bee communities and changes in the DNA of the Euglossini population may be influenced by the loss of habitats.

Introdução geral

O declínio das abelhas no mundo é evidente e preocupante (Otto et al. 2016; Koh et al. 2016) considerando que elas são essenciais para os serviços ecossistêmicos (Neame et al. 2013; Botsch et al. 2017), por serem responsáveis pela polinização de grande parte da diversidade de plantas e por realizarem esta tarefa com rapidez e agilidade (Gullan & Cranston 2014). Além da inestimável importância das atividades ecológicas prestadas pelas abelhas à manutenção da flora nos biomas e consequente conservação da diversidade de plantas, estes insetos também são responsáveis pela produção de alimento humano e animal decorrente do mecanismo de transferência do pólen realizado no processo de polinização (Gullan & Cranston 2014; Antonini et al. 2016; Otto et al. 2016; Botsch et al. 2017).

As abelhas como os demais insetos são compostas de exoesqueleto e partes externas organizadas em cabeça, tórax e abdômen (Rafael et al. 2012) (Figura 1). Na cabeça estão conectados os principais sistemas sensoriais deste inseto (Figura 2, A-B). O sistema digestório é composto por aparelho bucal adaptado para mergulhar a longa língua em néctar e mel que adere aos pelos e é recolhido para o espaço entre a gálea e os palpos labiais (Figura 2, C) (Michener 2007). No tórax e abdômen estão presentes as estruturas morfológicas que podem ser diferentes entre a grande diversidade de abelhas da fauna brasileira, tais como a densidade de pelos que facilita o processo de polinização, a tíbia e o tarsômero basal da perna posterior são modificados para a coleta e transporte de pólen (Figura 2, D-E) (Gullan & Cranston 2014). O corpo das abelhas é coberto de pelos onde se aderem os grãos de pólen durante as visitas florais (ver pelos na Figura 5), além da anatomia e tamanhos variáveis, algumas espécies de abelhas são abundantes em todos os biomas e a riqueza de espécies está estimada em mais de 20.000 em todo o mundo e cerca de 1.800 catalogadas no Brasil (Imperatriz-Fonseca et al. 2012; Gullan & Cranston 2014).

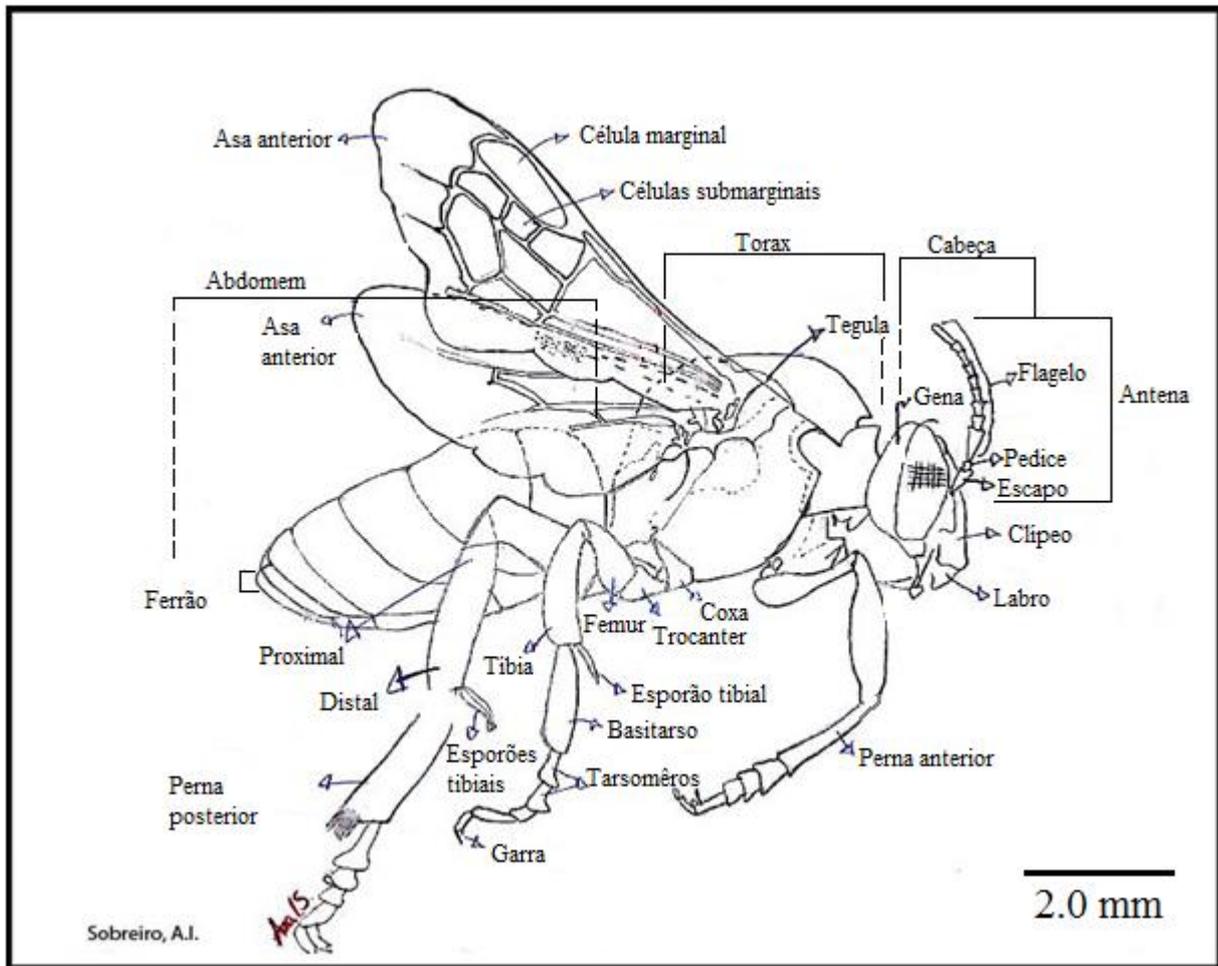


Figura 1. Morfologia externa de abelhas (Hymenoptera: Apidae). Ilustrações realizadas por Sobreiro, A.I., pelas considerações de Silveira et al. 2002.

Abelhas podem apresentar graus de socialidade - desde solitárias a altamente sociais e comportamento generalista: abelhas que forrageiam em uma grande diversidade de plantas em busca de recursos florais necessários para sua sobrevivência e da prole (Morandin et al. 2013; Rubene et al. 2015; Fowler et al. 2016; Dar et al. 2017), ou especialistas abelhas que utilizam um recurso específico ou apresentam adaptações especiais para explorar determinado recurso, ou ainda, polinizam fielmente um determinado grupo de plantas (Gullan & Cranston 2014). Neste contexto, devido à intensificação das práticas agrícolas os remanescentes florestais estão se tornando cada vez mais fragmentados, podendo afetar drasticamente a diversidade de polinizadores e levar a extinção de espécies (Ferronato et al. 2017). Por isso, medidas de conservação são o primeiro passo para evitar a perda da biodiversidade, restaurando o equilíbrio do ecossistema e o balanço das populações silvestres (Hagen et al. 2012; Neame et al. 2013; Fowler et al. 2016; Botsch et al. 2017; Ferronato et al. 2017).

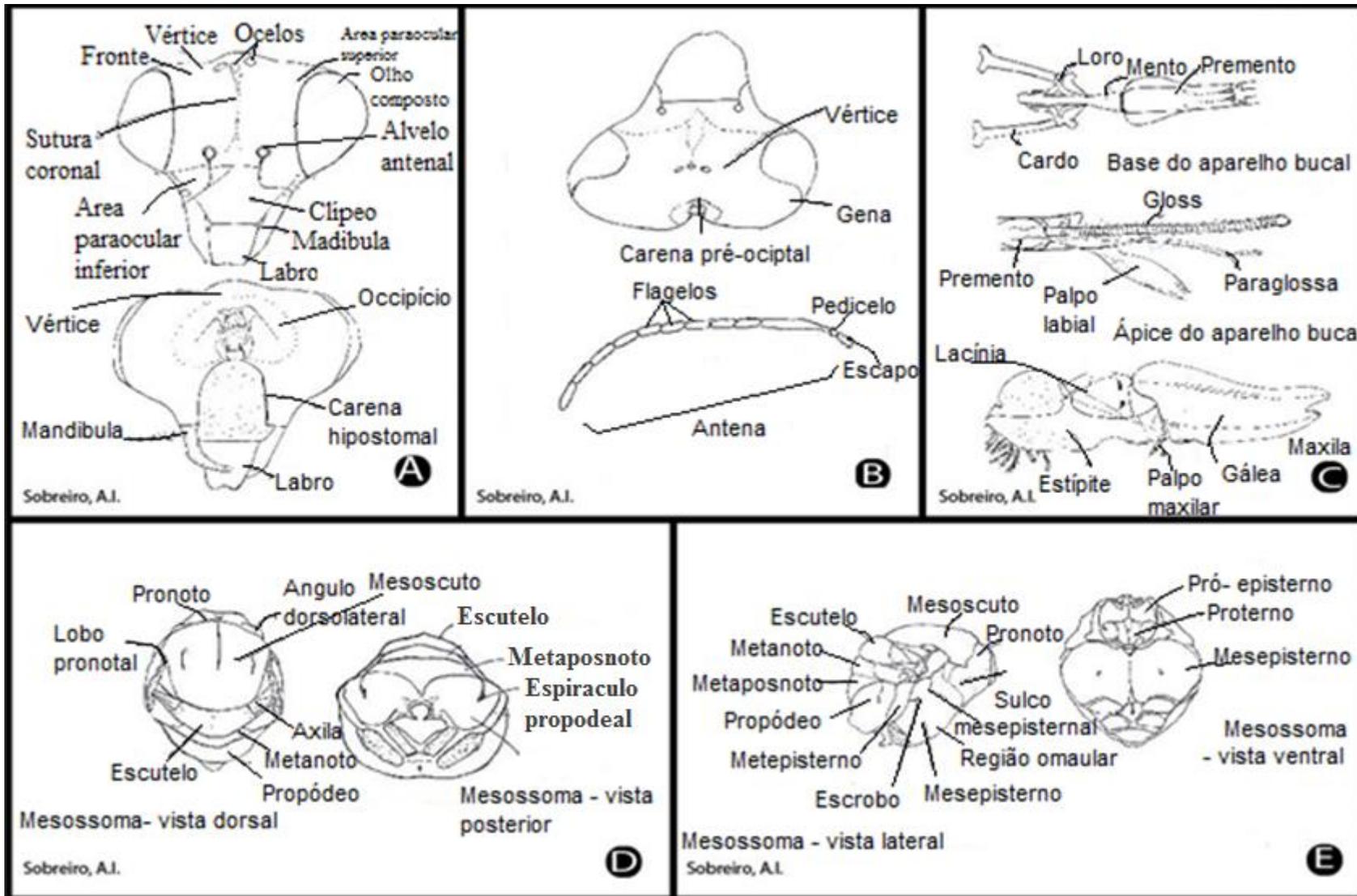


Figura 2. Morfologia externa de abelhas. Estruturas da cabeça (A), área occipital e antenal (B), aparelho bucal (C), visão dorsal e frontal do tórax (D) e visão lateral e ventral do tórax (E). Ilustrações realizadas por Sobreiro, A.I., pelas considerações de Silveira et al. 2002.

Euglossina ou “abelhas das orquídeas” é um grupo de abelhas exclusivo da região neotropical, responsáveis pela polinização de uma grande diversidade de plantas com utilização econômica e ecológica (Figura 3) (Dressler 1982). Os machos de Euglossini são atraídos por compostos sintéticos semelhantes aos odores das flores (Rêbello & Cabral 1997) o que auxilia e incentiva estudos com levantamento da fauna destas abelhas em diversas regiões e biomas neotropicais (Raw 1989; Silveira et al. 2011; Gonçalves et al. 2014; Giangarelli et al. 2015). Pesquisas sugerem que algumas espécies podem servir como bioindicadores de ambientes conservados e alterados (Morato 1994, Ramalho et al. 2009; Aguiar & Ganglianone 2012).

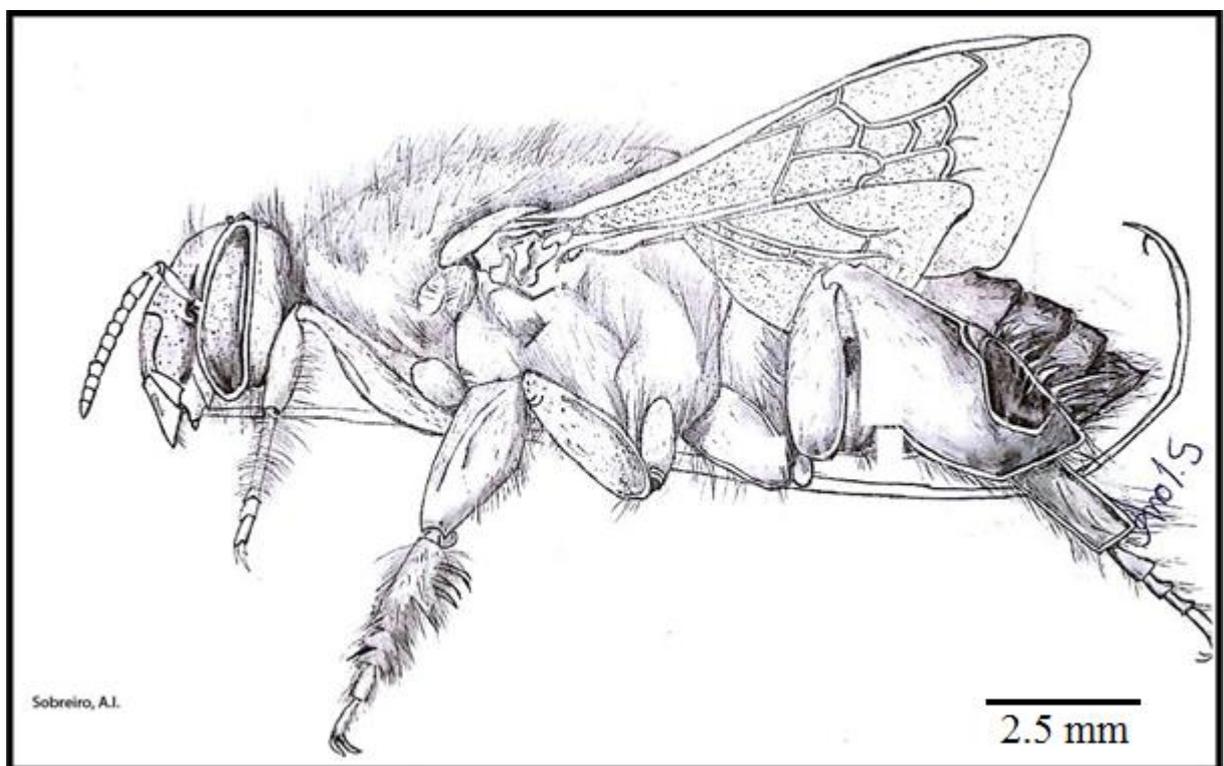


Figura 3. Ilustração das estruturas morfológicas externas de Euglossini.

O gênero *Euglossa* Latreile, 1802, é o mais diversificado de Euglossini, representado por aproximadamente 140 espécies (Nemésio & Rasmussen 2011), dividido em seis subgêneros (Dressler 1978). As abelhas pertencentes a este gênero se distinguem dos demais grupos por possuírem labro esbranquiçado com duas manchas ovais transparentes (manchas paraoculares) (Michener 2007), e brilho metálico colorido que varia entre tons de verde intenso, azul, vermelho a roxo (Silveira et al. 2002; Nemésio 2009; Ferrari et al. 2017), outra característica morfológica importante na delimitação de espécies do gênero é o formato do coxim da perna média (Figura 4, A-B). As relações filogenéticas são concomitantes com a



Figura 5. Estrutura florestal, floresta madura ou primária (A) e floresta secundária em regeneração natural (B).

A Floresta Atlântica é conhecida como um bioma que apresenta alta biodiversidade e endemismo, porém simultaneamente sofre com constantes ameaças de extinção (Myers et al. 2000; Ribeiro et al. 2009; Brasil 2010) e por isso, o desenvolvimento de práticas de restauração nestes ambientes, como o reflorestamento (Rodrigues et al. 2009), tem sido uma ferramenta de suma importância na tentativa de recuperar a vegetação nativa e minimizar os efeitos negativos da perda de biodiversidade. Alguns autores afirmam que as medidas de reflorestamento representam uma das primeiras etapas para recuperar um determinado ecossistema em que a vegetação nativa tenha sido perdida, restabelecendo assim as diferentes relações ecológicas, como interações planta-polinizador e o complemento original de organismos (Lamb 2001; Forup & Memmott 2005).

Estudos realizados na Floresta Atlântica destacam a importância de habitats reflorestados localizados próximos aos remanescentes florestais para a reintegração da comunidade de abelhas (Ferronato et al. 2017) e a importância de pequenos fragmentos de florestas para a abundância e riqueza de espécies (Nemésio 2014), sugerindo assim a conservação desses habitats, principalmente em áreas em processo de regeneração e com matrizes agrícolas (Aguiar & Gaglianone 2012).

O bioma Cerrado, reconhecido como a savana mais rica do mundo também é considerado, assim como a Mata Atlântica, um *hotspots* de biodiversidade devido a grande abundância de espécies endêmicas e a sua constante perda de habitat (Myers et al. 2000; Silva et al. 2012). Estudos caracterizam a importância que esse bioma representa para a comunidade de abelhas por ser composto de diferentes formações florestais, reforçando a ideia de que as

diferentes fitofisionomias dentro do Cerrado aumenta a diversidade de espécies de abelhas, além de funcionar como corredores biológicos para as mesmas. Assim, a conservação desses diferentes tipos de vegetação é fundamental para manter a diversidade desses polinizadores (Silveira et al. 2015; Antonini et al. 2016).

Considerando que a intensificação das atividades agrícolas, perda e fragmentação de habitat são consideradas as principais ameaças à diversidade biológica (Brittain et al. 2010; Dobrovolski et al. 2011), é evidente que medidas de preservação devem ser realizadas para garantir o sucesso das espécies no ecossistema que habitam (Almeida et al. 2011). Outros autores enfatizam que a presença de determinadas espécies de polinizadores nos habitats pode funcionar como indicativos de perturbação (Rocha-Filho & Garófalo 2013) ou qualidade ambiental, o que poderia determinar o possível sucesso na restauração de habitats (Ferronato et al. 2017).

Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da recuperação de florestas sobre a diversidade, morfologia e filogenia de abelhas silvestres em uma região de domínio da Floresta Atlântica e Cerrado, no centro-sul do Brasil.

Objetivos específicos

CAPÍTULO I

Investigar as diferenças na composição e uniformidade das abelhas das orquídeas em microambientes contínuos, a fim de caracterizar a resposta da mudança do ambiente local na atração de abelhas.

CAPÍTULO II

Investigar a composição e abundância das espécies de abelhas em habitats locais com diferentes estágios de conservação, para caracterizar as respostas da rápida perda de habitats sobre as comunidades de abelhas no uso de recursos florais.

CAPÍTULO III

Avaliar a distribuição geográfica dos haplótipos e as visões taxonômicas opostas sobre a filogenética de *Euglossa annectans*, a fim de elucidar a identidade das unidades biológicas envolvidas usando marcadores moleculares mitocondriais.

Diversidade de Euglossini



Capítulo 1

Abelhas das orquídeas associadas a microambientes contínuos beneficiam-se do remanescente florestal, Mata Atlântica, Paraná, Brasil

Resumo

A fragmentação e a perda de habitats são as principais causas do declínio de polinizadores no mundo, porém muito pouco se sabe sobre a composição e distribuição de polinizadores neotropicais ao longo de microambientes contínuos. Para preencher essa lacuna, foram realizadas amostragens de Euglossini em uma área contínua de floresta com microambientes de floresta primária (remanescente) e secundária (regeneração) da Mata Atlântica. Objetivamos avaliar as diferenças na composição e uniformidade das abelhas das orquídeas em microambientes contínuos, a fim de caracterizar as respostas das mudanças do ambiente local na atração de abelhas por armadilhas químicas. Os resultados indicaram que a composição e uniformidade foram semelhantes entre os dois fragmentos florestais estudados, embora foi constatado a maior abundância de algumas espécies por micro-ambientes. Concluímos que as características dos sítios em um ambiente contínuo com floresta primária e secundária não parecem ter efeito sobre a composição da fauna de Euglossini, e que as essências químicas são complementares na atratividade dos gêneros da tribo. Assim, nossos achados sugerem que micro-ambientes em remanescentes florestais contínuos próximos podem ajudar a promover a reintegração da comunidade de abelhas de orquídeas e contribuir para a conservação de áreas em regeneração florestal.

Palavras-Chave: Conservação, Diversidade, Euglossini, Polinização, Floresta primária versus floresta secundária.

Abstract

The fragmentation and loss of habitat are the main causes of declining pollinators in the world, however very little is known about the composition and distribution of neotropical pollinators along continuous micro-environments. To fill this gap, we carried out samples of Euglossini in a continuous area of forest with micro-environments of primary (remnant) and secondary (regeneration) forest of Atlantic Forest. We evaluated the differences in the composition and uniformity of orchid bees in different micro-environments, in order to characterize the responses of the local environment changes in the attraction of bees to chemical traps. Our results indicated that the composition and uniformity were similar between the two forest fragments studied here, although there is greater abundance of some species by micro-environments. We conclude that the characteristics of the sites in a continuous environment with primary and secondary forest do not seem to have an effect on the composition of the Euglossini fauna, and that the chemical essences are complementary in the attractiveness of the genera of the tribe. Thus, our findings suggest that micro-environments in a continuous near forest remnants can help to promote the reintegration of the orchid bee community and contribute to the conservation of areas in forest regeneration.

Keywords: Conservation, Diversity, Euglossini, Pollinators, Primary versus secondary forest.

Introdução

s abelhas das orquídeas (Apidae: Euglossini) compreendem mais de 200 espécies descritas, incluindo cinco gêneros, sendo dois deles cleptoparasitas (Dressler 1982; Cameron 2004; Nemésio 2009; Moure et al. 2012). Essas abelhas são polinizadoras essenciais na região Neotropical e são responsáveis pela polinização de diversas plantas de importância econômica e ecológica (Dressler 1982; Ramírez et al. 2002; Santos & Absy 2010; Gianinni et al. 2015). Além disso, algumas espécies de abelhas das orquídeas são consideradas bioindicadoras de áreas conservadas e outras são amplamente distribuídas em ambientes perturbados e fragmentados (Morato 1994; Peruquetti et al. 1999; Aguiar & Ganglianone 2008). Estudos explorando a diversidade de abelhas das orquídeas em escalas a nível ecológico e molecular são comuns na região Neotropical (Raw 1989; Silveira et al. 2011; Boff et al. 2014; Gonçalves et al. 2014; Eltz et al. 2015; Giangarelli et al. 2015; McCravy et al. 2016; Soro et al. 2016) pois, machos destas abelhas são facilmente atraídos por compostos químicos (Dodson et al. 1969).

Embora recentemente tenha sido registrada a expansão populacional de poucas espécies ao sul da América do Norte (Skov & Wiley 2005; Pemberton & Wheeler 2006; Eltz et al. 2015; Griswold et al. 2015), as abelhas das orquídeas são extremamente diversificadas na América Central e do Sul (Sofia et al. 2004; Ramalho et al. 2009; Cordeiro et al. 2012; Matozzo et al. 2011; Aguiar & Ganglianone 2012; Gonçalves et al. 2014; McCravy et al. 2016; Botsch et al. 2017; Ferronato et al. 2017). Na América do Sul, a Mata Atlântica (MA) é conhecida por ser um *hotspot* para a tribo Euglossini. Aproximadamente 50 espécies já foram registradas nesse ecossistema brasileiro (Sofia et al. 2004; Nemésio 2009; Cordeiro et al. 2012; Gonçalves et al. 2014; Ferronato et al. 2017). Embora a fauna de abelhas das orquídeas seja considerada diversificada na MA, sua comunidade parece depender das características do ambiente local (Moreira et al. 2015).

O processo histórico de uso e ocupação do solo na MA alterou profundamente os habitats, que da cobertura original, apenas 7.26% é domínio de floresta natural. Vários fragmentos são em sua maioria cercados por monoculturas, pastagens e cidades (BRASIL 2009). Assim, os fragmentos de MA são geralmente pequenos (<50 ha) e isolados (Ribeiro et al. 2009). Embora as abelhas das orquídeas sejam consideradas boas voadoras, a

¹ Microambiente = é um microecossistema, um espaço limitado em que se reproduz as condições que requerem alguns animais e plantas para a sobrevivência. Definição neste estudo.

fragmentação pode alterar seu alcance de dispersão, afetando a diversidade local, uma vez que fragmentos florestais pequenos em áreas urbanas podem funcionar como importantes áreas de refúgios (Cerântola et al. 2010; Neame et al. 2012; Storck-Tonon et al. 2013; Oliveira et al. 2015; Fischer et al. 2016).

Estudos em nível molecular mostraram que as populações de abelhas das orquídeas em áreas urbanas não parecem sofrer com problemas genéticos (por exemplo, a endogamia), o que pode indicar que estas abelhas estão adaptadas a este ambiente (Cerântola et al. 2010). Em outro estudo, os autores investigaram a população em fragmentos isolados em ilhas oceânicas. Esses autores descobriram que o coeficiente de endogamia é maior em ilhas isoladas, mas a população não está sobre risco de extinção local, em função de vórtices masculinos diploides, mesmo quando o mar atua como uma barreira geográfica à dispersão (Boff et al. 2014). Apesar de ambos os estudos terem sido conduzidos em diferentes ambientes e em nível molecular, eles mostraram que a escala temporal pode ser um fator importante para o restabelecimento populacional. Assim, a questão que ainda permanece é: Como seria o efeito das fragmentações que as abelhas foram mais recentemente submetidas? Eventos mais recentes de fragmentação afetariam a riqueza e a diversidade local de abelhas das orquídeas em comparação com áreas menos fragmentadas?

Até recentemente, estudos comparando o padrão de comunidades de abelhas das orquídeas em estágios de regeneração e preservação florestal são raros (Moreira et al. 2015; Boscolo et al. 2017; Ferronato et al. 2017). A fim de fornecer novas informações sobre este tópico, comparamos o potencial de atração de abelhas das orquídeas para iscas químicas em múltiplos microambientes¹ distribuídos em áreas contínuas de floresta primária e secundária.

Testamos neste estudo, se diferentes microambientes contínuos em florestas primárias ou secundárias afetam: (i) os índices de diversidade das abelhas das orquídeas e, (ii) em escala temporal, padrões de distribuição de espécies. Definimos floresta primária e secundária como a heterogeneidade da vegetação em cada local de amostragem, classificadas de acordo com os padrões ambientais brasileiros (IBAMA 1991; BRASIL 1994). Portanto, o presente trabalho investigou as diferenças na composição e uniformidade das abelhas das orquídeas em diferentes microambientes, a fim de caracterizar a resposta da mudança do ambiente local na atração de abelhas às armadilhas químicas.

¹ Microambiente = é um microecossistema, um espaço limitado em que se reproduz as condições que requerem alguns animais e plantas para a sobrevivência. Definição neste estudo.

Materiais e métodos

Área de estudo

O estudo foi conduzido em seis diferentes locais de amostragem selecionados em fragmentos florestais de uma matriz contínua com dois habitats distintos: floresta primária e secundária. Todos os sítios de amostragem ($n = 6$) estão localizados no município de Foz do Iguaçu, no Refúgio Biológico Bela Vista (RBV), oeste do Paraná, Brasil. A reserva (RBV) cobre uma unidade de conservação de 1920 ha que faz parte do complexo Itaipu Binacional, com Floresta Estacional Semidecidual. A área é cercada pelo reservatório de Itaipu, alternando entre culturas de soja e milho e está a 1300 m dos limites da cidade. Esta área inclui fragmentos em estágios avançados de regeneração e uma parte com remanescente de floresta nativa. Destes fragmentos, selecionamos três sítios situados na floresta primária e outros três sítios situados na floresta secundária (Figura 6).

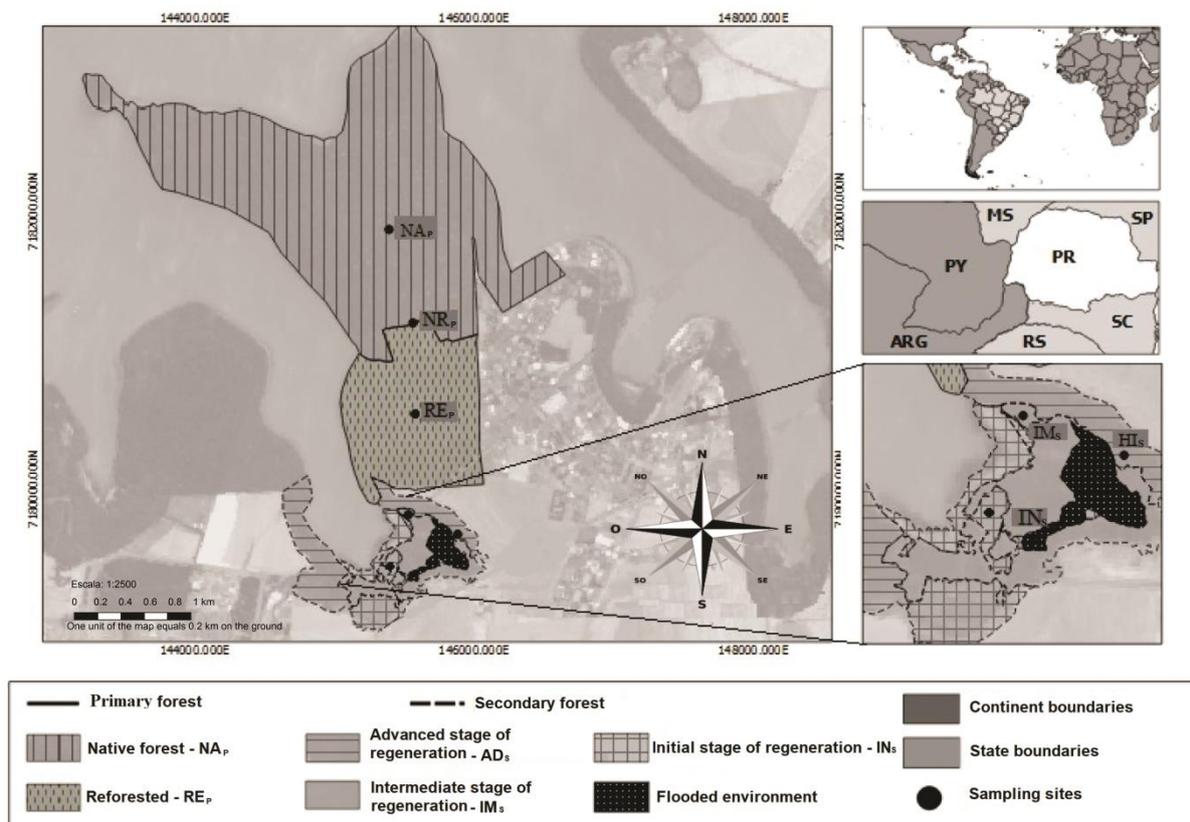


Figura 6. Localização dos fragmentos (floresta primária e secundária) e de cada sítio de amostragem utilizado no estudo para as comunidades de abelhas Euglossini no Estado do

Paraná, Brasil. Floresta primária: sítios de amostragem (NA_p, NR_p e RE_p). Floresta secundária: sítios de amostragem (IN_s, IM_s e AD_s).

Características dos sítios e complexidade do habitat

Usamos dados de imagens de satélite Google Earth Pro e Global Forest Change dataset (Hansen et al., 2013) para distribuir os sítios de amostragem em diferentes matrizes contínuas. As características dos sítios (Tabela 1) foram determinadas antes do início da amostragem. O tamanho de cada sítio foi calculado usando aplicativos métricos dos programas de satélite (Google Earth Pro e Global Forest Change dataset). A distância de um sítio a outro em cada floresta foi estabelecido em um intervalo entre 500-560 m (Figura 6). As informações de georreferenciamento foram digitalizadas usando o software QGIS versão 2.18 (2016). A classificação da vegetação de acordo com Brasil (1994) é fornecida na Tabela 1.

Tabela 1. Gradiente ambiental: coordenadas geográficas, elevação (m), idade da vegetação (anos), tamanho dos locais (ha), estágio da floresta (Brasil, 1994) e locais de amostragem contínua da floresta primária e secundária, região oeste do Paraná sul do Brasil.

Gradiente ambiental	Floresta primária			Floresta secundária		
	Floresta Nativa (NA _p)	Transição entre floresta Nativa e Reflorestamento (NR _p)	Reflorestamento (RE _p)	Estágio INicial de regeneração (IN _s)	Estágio InterMediário de regeneração (IM _s)	Estágio Avançada de regeneração (AD _s)
Coordenada geográfica	25°26'2069"S 54°31'2932"O	25°26'3809"S 54°31'2721"O	25°26'5487"S 54°31'2466"O	25°27'3502"S 54°31'3147"O	25°27'2341"S 54°31'2849"O	25°27'2861"S 54°31'1164"O
Elevação (m)	251	246	247	224	224	238
Idade (anos)	> 40 ^a	> 40 ^a	> 40 ^a	≤ 5 ^b	≤ 10 ^b	≤ 15 ^b
Tamanho (ha)	315.70	---	96.30	19.98	27.32	23.70
Estágio da floresta	Primária (remanescente)	Primária (transição)	Primária (reflorestamento)	Secundária (inicial)	Secundária (intermediária)	Secundária (Avançada)
Aspectos ambientais dos sítios	Floresta nativa de difícil acesso, conservação intocada	Transição nativa / reflorestada	Plantações de mudas nativas da Mata Atlântica	Um campo aberto coberto por lianas densas	Floresta com poucas árvores distantes umas das outras, formando clareiras como bosque	Floresta verde, bosque e ambiente inundado

^a Referência utilizada para caracterizar os sítios florestais primários (ITAIPU, 1978).

^b Referência usada para caracterizar os locais de florestas secundárias (Ziober & Zanirato, 2014).

--- Divisão entre os sítios NAP e REP, não é possível medir o tamanho (ha).

Floresta primária é toda comunidade vegetal com grande diversidade biológica e mínimos efeitos antrópicos, não afetando características originais da estrutura da floresta (BRASIL 1994). Esta estrutura florestal favorece a regeneração de espécies tardias e a formação de bancos de sementes (Clements 1916; BRASIL 1994), conhecida também como “floresta climax” ou floresta madura. Na região de estudo, as florestas são classificadas como Floresta Estacional Semidecidual (IBAMA 1991), uma das principais formações de Floresta Atlântica (BRASIL 2010a). O sistema nacional florestal determina a formação primária como floresta natural (BRASIL 2010b) ou remanescentes florestais. Neste estudo, a floresta primária é composta por remanescente florestal (nativo) e reflorestamento (que foi realizado com > 40 anos) (ITAIPU 1978; Ziober & Zanirato 2014) (ver [Figura 6](#)).

A floresta secundária é um habitat que se recuperou após uma grande perturbação, resultante de processos naturais de sucessão (BRASIL 1994). Vegetação geralmente jovem (< 15 anos), constituída por campos abertos, alta incidência luminosa e espécies de plantas pioneiras com estágios evidentes de regeneração (inicial, intermediário e avançado) (Clements 1916; BRASIL 1994). Neste estudo, a floresta secundária é composta por três estágios de regeneração (inicial, intermediário e avançado), sendo um fragmento florestal que perdeu a vegetação original e está se regenerando naturalmente (ver [Figura 6](#)).

Amostragem das abelhas

Machos de abelhas Euglossini foram amostrados durante 12 meses (Outubro de 2013 à Setembro de 2014) em todos os sítios ([Figura 6](#)). Em cada sítio, foram utilizadas quatro armadilhas de isca aromáticas, cada uma com uma essência diferente (cineol, eugenol, salicilato de metila e vanilina). As armadilhas permaneceram em cada sítio durante os meses inteiros, totalizando após 12 meses, 8640 horas de exposição (12 meses x 30 dias x 24 horas). As armadilhas foram fixadas em um suporte de madeira a uma altura média de 1,5 m do solo e visitadas mensalmente para coleta de abelhas, limpeza e substituição das essências.

As armadilhas foram feitas de garrafas plásticas transparentes tipo Pet (com modificações do modelo de Campos et al. 1989) ([Figura 7](#)). No fundo de cada armadilha

(garrafa) foi adicionada uma solução contendo as seguintes proporções: água (200 ml), álcool 92.6% (100 ml), duas colheres médias de sal de cozinha (5 g) e uma medida de detergente neutro (15 ml) (incolor e neutro). A solução foi substituída uma vez por mês. As essências foram armazenadas em pequenos frascos de vidro com uma pequena abertura na tampa feito para a passagem de um pedaço de barbante, onde a fragrância volatilizaria por capilaridade. No laboratório, as abelhas coletadas foram limpas, montadas em alfinetes entomológicos e identificadas com auxílio de especialista (R. B. Gonçalves, Universidade Federal do Paraná). Os exemplares de abelhas foram depositados no Laboratório de Apicultura, e os exemplares de plantas no Museu da Biodiversidade – Herbário da FCBA/UFGD.

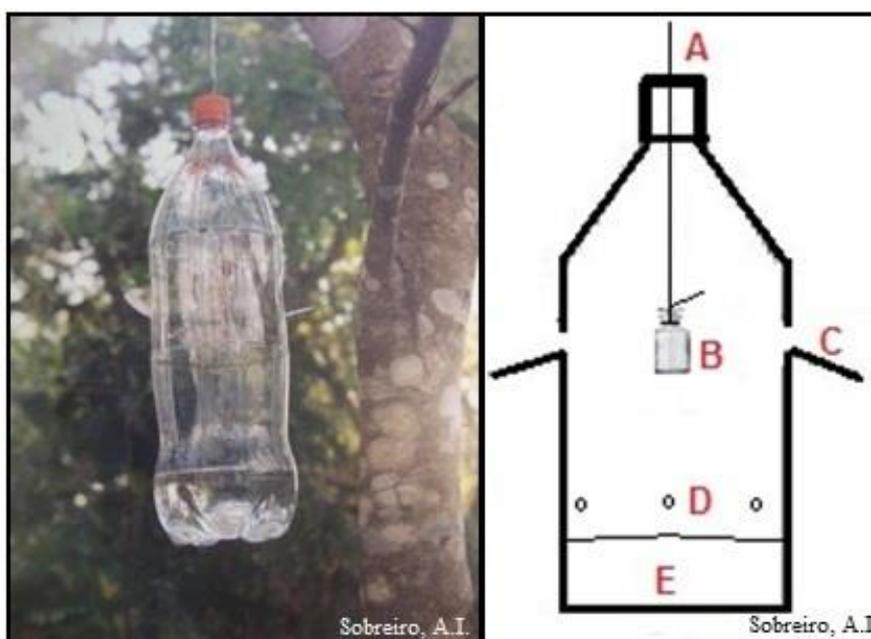


Figura 7. Armadilhas de isca aromática desenvolvidas com garrafas plásticas transparentes tipo Pet de 2000 ml. (A) Bocal com arame para suportar a armadilha suspensa; (B) Pequenos frascos de vidro cheios de essência química e um pedaço de barbante que serviu como pavio para a dispersão da essência; (C) Duas aberturas laterais de diâmetro igual (2 cm) com abas para funcionar como “área de pouso” das abelhas; (D) Seis aberturas circulares para drenar o excesso de água; (E) Solução. Modificações do modelo de Campos et al. (1989). Equipe do Laboratório de Abelhas e pesquisadores sobre Euglossini da UFGD utilizam o modelo de armadilha ilustrada acima.

Análise dos dados

Para comparar a diversidade entre os seis sítios, utilizamos o índice de Shannon-Wiener (H'). A dominância das espécies em cada sítio foi calculada por Berger-Parker (d) e Simpson ($D-1$) (Melo 2008). Por fim, Evenness (J') foi usado para definir a uniformidade ou homogeneidade da distribuição das espécies nos sítios (Magurran 2004).

A curva de rarefação para riqueza de espécies de cada sítio estudado foi obtida utilizando-se 1000 randomizações, comumente utilizadas para avaliar o esforço amostral. Neste estudo, utilizamos a curva de rarefação para comparar o esforço de amostragem entre microambientes (6 sítios) e entre as duas florestas. A amostragem total do estudo foi representada por 288 amostras, que correspondem a 12 amostras (uma amostra de abelhas por mês durante 12 meses) em cada sítio (total de 6 sítios) para cada essência (total de 4 essências), ou seja, 12 amostras x 6 sítios x 4 essências = 288 amostras no total. A Análise de Correspondência Destendenciada (DCA) foi utilizada para avaliar a relação entre a comunidade de abelhas nos microambientes contínuos. O índice de Sørensen-Dice foi usado para comparar semelhanças entre os sítios e a riqueza de espécies. Para realizar análise de correspondência e a curva de rarefação, empregamos o pacote *vegan* (Oksanen et al. 2018) usando o software R versão 3.4.1 (R Development Core Team, 2017).

Esse software também foi utilizado para realizar a Análise de Variância (ANOVA) e para determinar se haviam diferenças significativas para: (i) número de espécies por mês; (ii) número total de espécies entre os tipos de floresta; (iii) número de espécies entre os sítios; (iv) abundância de espécies por essência química. A função *specnumber* localiza o número de espécies usando o argumento *MARGIN*. Se o experimento tiver mais de um fragmento ou local de amostragem, ela será usada se os grupos de parâmetros e a função encontrar o número total de espécies para cada parâmetro (Hurlbert 1971). Usamos essa função para determinar se a riqueza foi significativa para os meses, tipos de floresta, entre os sítios e essência química. Essa função também foi usada para calcular o índice de diversidade, então aplicamos a ANOVA para determinar se havia diferença significativa.

Finalmente, com o objetivo de comparar a distribuição temporal das espécies de *Euglossini* nos dois fragmentos florestais, desenvolvemos um histograma com todas as frequências de espécies por mês amostrado. Para fazer o histograma, usamos a função *poncho.R*, sendo a análise realizada com auxílio do software R (R Development Core Team, 2013). A função *poncho* é usada para criar histogramas e múltiplos gráficos de distribuição de

espécies em uma comunidade em relação à gradientes ambientais ou variáveis experimentais (Dambros 2014). No presente estudo, o intervalo de confiança foi de 99%.

Resultados

Durante o estudo, coletamos 586 machos de abelhas das orquídeas pertencentes a quatro gêneros e oito espécies (Tabela 2). Destes, 285 foram coletados na floresta primária e 301 espécimes foram coletados na floresta secundária. A abundância foi diferente por mês ($df = 11$, $F = 3.987$, $p = 0.0002$), embora não variou significativamente entre os tipos de florestas ($df = 1$, $F = 0.0451$, $p = 0.832$). As mesmas espécies de abelhas das orquídeas ($n = 8$) foram amostradas em ambos os fragmentos florestais (floresta primária e secundária). A maior abundância de abelhas das orquídeas na floresta secundária foi encontrada no sítio AD_S ($n = 162$ indivíduos) e na floresta primária no sítio RE_P ($n = 131$ indivíduos). No entanto, o sítio com a menor abundância e diversidade foi o NR_P com 62 indivíduos (6 spp.) e IN_S com 66 indivíduos (7 spp.). A abundância não variou significativamente entre os sítios amostrados ($df = 5$, $F = 0.9439$, $p = 0.4559$).

Euglossa annectans Dressler 1982 foi à espécie mais abundante em ambos os fragmentos (floresta primária e secundária), com abundância relativa de 70.52% ($n = 201$) e 42.19% ($n = 127$), respectivamente. *Eufriesea auriceps* (Friese 1899) foi a menos abundante com 0.35% ($n = 1$) na floresta primária e 2.32% ($n = 7$) na floresta secundária.

O índice de Shannon-Wiener (H') indicou a floresta secundária com maior diversidade ($H' = 1.66$) do que a floresta primária ($H' = 1.08$). A diversidade foi maior no sítio AD_S ($H' = 1.69$) e menor no sítio NR_P ($H' = 0.80$). Considerando o índice de Berger-Parker (d), a dominância foi maior no fragmento de floresta primária ($d = 0,70$) do que no fragmento de floresta secundária ($d = 0,41$). Entre os sítios, a maior dominância foi encontrada em NR_P ($d = 0.79$) com a maior abundância de *Eg. annectans*, enquanto o menor domínio foi registrado no sítio AD_S ($d = 0.38$). O índice de Simpson foi menor na floresta secundária ($D = 0.75$) do que na floresta primária ($D = 0.48$). Para os sítios amostrados, o índice de Simpson em AD_S mostrou menor dominância ($D = 0.77$), enquanto em NR_P apresentou maior dominância ($D = 0.36$). Equitabilidade foi maior na floresta secundária ($J' = 0.80$) do que na floresta primária ($J' = 0.52$). Entre os sítios, o sítio IN_S obteve a máxima Equitabilidade ($J' = 0.83$), seguido pelo sítio AD_S ($J' = 0.81$). Os sítios com menor Equitabilidade foram NA_P ($J' = 0.41$) e NR_P ($J' = 0.44$) (Tabela 2).

Tabela 2. Espécies de abelhas das orquídeas atraídas com essências em microambientes contínuos de dois fragmentos florestais (primários e secundários) da Mata Atlântica, Brasil. Abundância total, Índice de diversidade (H'), dominância ($D-1$ e d) e Equitabilidade (J').

Espécies	Floresta primária			Floresta secundária		
	NA _P	NR _P	RE _P	IN _S	IM _S	AD _S
<i>Euglossa annectans</i> Dressler, 1982	72	49	80	24	41	62
<i>Euglossa cordata</i> (Linnaeus, 1758)	2	3	23	6	4	26
<i>Euglossa fimbriata</i> Moure, 1968	6	0	5	7	1	5
<i>Euglossa pleosticta</i> Dressler, 1982	1	6	14	12	6	25
<i>Eufriesea auriceps</i> (Friese, 1899)	1	0	0	0	3	4
<i>Eufriesea violacea</i> (Blanchard, 1840)	8	1	7	14	11	27
<i>Eulaema nigrita</i> Lepeletier, 1841	1	1	1	2	6	9
<i>Exaerete smaragdina</i> (Guérin, 1844)	1	2	1	1	1	4
Total de indivíduos	92	62	131	66	73	162
Total de espécies	8	6	7	7	8	8
Shannon-Wiener (H')	0.86	0.80	1.20	1.63	1.42	1.69
Simpson ($D-1$)	0.37	0.36	0.58	0.76	0.64	0.77
Berger-Parker (d)	0.78	0.79	0.61	0.36	0.56	0.38
Equitabilidade (J')	0.41	0.44	0.61	0.83	0.66	0.81

A curva de rarefação usada para comparar a riqueza de espécies sugere que a riqueza da floresta primária e secundária se estabilizou atingindo a assíntota. Sendo que na floresta primária estabilizou na 126^a amostra, enquanto na floresta secundária estabilizou na 136^a amostra. Por outro lado, comparando a curva de rarefação para os seis sítios de amostragem, o único sítio que se aproximou de estabilização foi o AD_S, enquanto os demais sítios não atingiram o número total de riqueza de espécies para o microambiente, a adequação da amostra não foi suficiente nos sítios NA_P, NR_P, RE_P, IM_S e IN_S. A eficiência amostral foi de 99.78 e a riqueza média estimada foi de 8.01 (Figura 8).

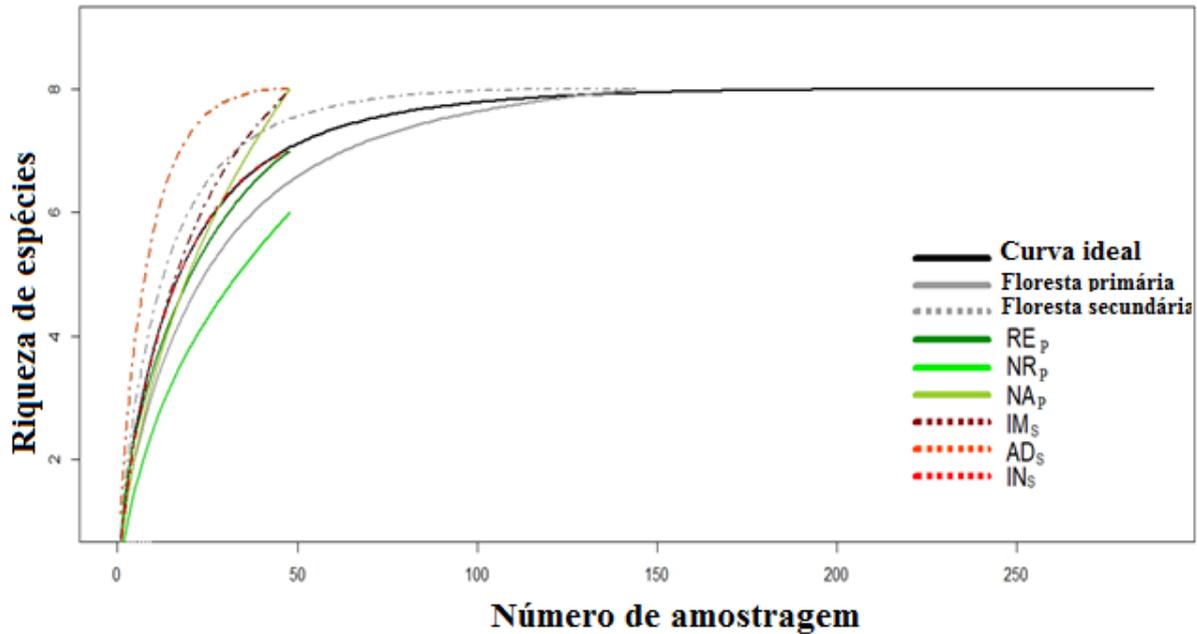


Figura 8. Curva de rarefação (1000 randomizações) para a riqueza de espécies e indivíduos de abelhas das orquídeas em função de sua abundância nos seis sítios de floresta primária e secundária de Mata Atlântica no Estado do Paraná, Brasil.

Verificamos que o padrão de distribuição das espécies por mês na floresta secundária apresentou maior frequência e abundância para todas as espécies de Euglossini, exceto *Eg. annectans* que foi mais frequente e abundante na floresta primária. *Eg. annectans* foi à única espécie que ocorreu durante 11 meses e a espécie mais abundante durante oito meses em ambas as florestas, representando 55.97% (328 indivíduos) do total de abelhas para a espécie. O mês com maior abundância na floresta primária foi Setembro de 2014 com 36.84% (105 indivíduos), enquanto na floresta secundária foi Agosto de 2014 com 17.60% (53 indivíduos). No mês de Outubro de 2013, apenas *Ef. auriceps* e *Ef. violacea* foram registradas no fragmento de floresta secundária. Além disso, a ANOVA indicou que a riqueza de espécies não variou significativamente por meses ($df = 11$, $F = 1.713$, $p = 0.0703$) e entre os tipos de florestas ($df = 1$, $F = 3.16$, $p = 0.0765$), embora variou significativamente entre os sítios ($df = 5$, $F = 15.54$, $p = 0.00732$ (Figura 9).

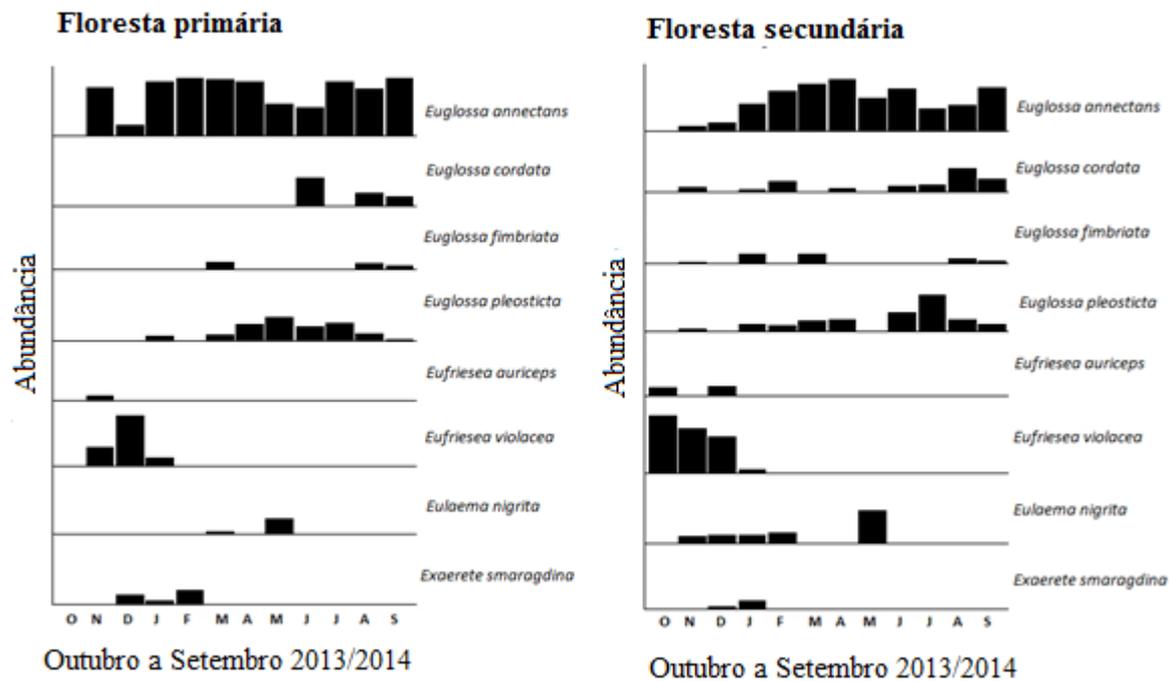


Figura 9. Histograma de distribuição temporal de abelhas Euglossini em fragmentos de Mata Atlântica primária e secundária no Estado do Paraná, Brasil. Outubro de 2013 à Setembro de 2014.

A Análise de Correspondência Destendenciada (DCA) revelou diferenças na ordenação da fauna de Euglossini entre os sítios de amostragem (Figura 10). Os sítios RE_P e IM_S são agrupados pelo padrão de ocorrência de espécies com diversidade, dominância e Equitabilidade semelhantes entre estes microambientes. Observamos que os sítios na floresta primária (NA_P, NR_P e RE_P) estão agrupados no lado esquerdo da ordenação e os sítios na floresta secundária (IN_S, IM_S e AD_S) estão agrupados no lado direito da ordenação, conectados pela semelhança entre os sítios RE_P e IM_S. Além disso, parece que *Eg. annectans* é a espécie posicionada mais próxima da floresta primária agrupada no lado esquerdo da ordenação (sítios de floresta primária), assim como é perceptível que *Ef. violacea* está mais próxima dos sítios da floresta secundária à direita da ordenação. *Euglossa cordata* e *Eg. pleosticta* foram agrupadas entre os sítios geograficamente mais próximos (sítios RE_P, IN_S e AD_S) com diferentes características de conservação entre microambientes (ver Figura 6) (Figura 10).

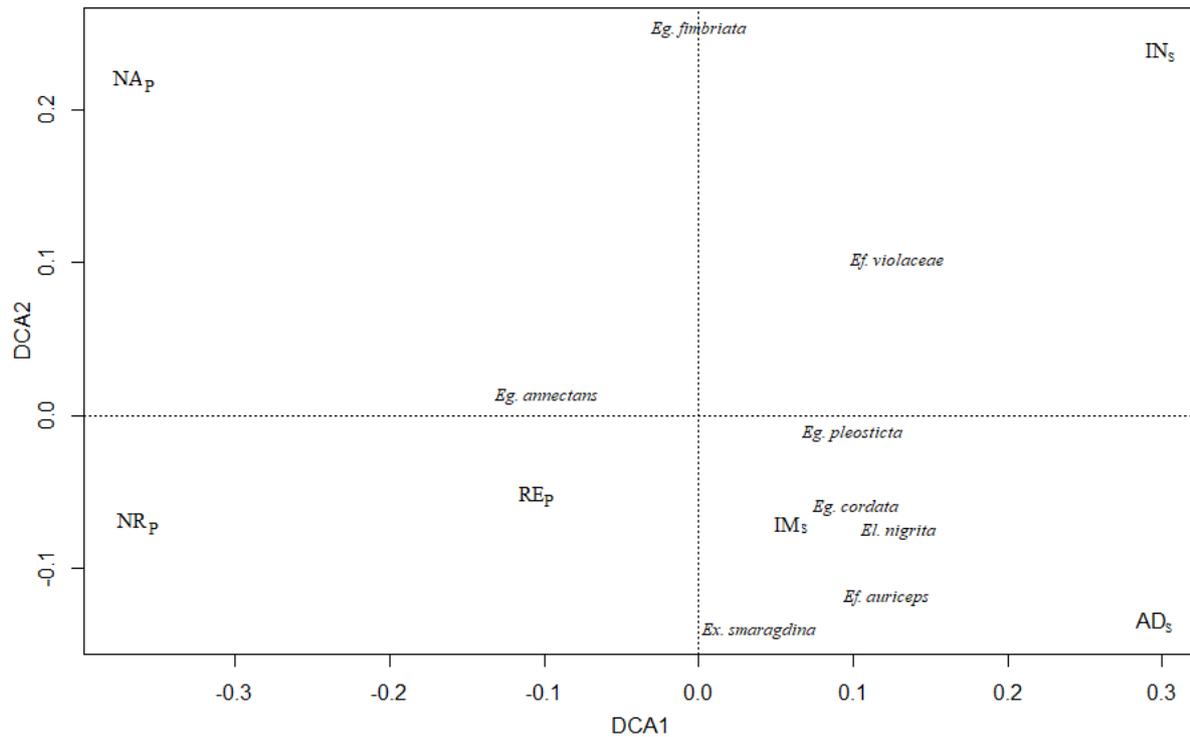


Figura 10. Análise de Correspondência Destendenciada (DCA) da comunidade de Euglossini dos sítios ($n = 6$) nos fragmentos de floresta primária (NA_P , NR_P e RE_P) e secundária (IN_S , IM_S e AD_S) de Mata Atlântica no Estado do Paraná, Brasil. De acordo com os coeficientes de Sørensen-Dice.

O papel dos aromas

Cineol foi o aroma mais eficiente na atração da maior abundância de espécies, representando 40.95% (240 indivíduos), seguido por eugenol, que atraiu 37.37% (219 indivíduos) do total de abelhas amostradas. Em ambas as florestas, as armadilhas de vanilina e salicilato de metila atraíram a menor abundância com 17.74% (104 indivíduos) e 3.92% (23 indivíduos), respectivamente. Na floresta primária, a essência mais atrativa foi eugenol com 47.01% (134 indivíduos) e na floresta secundária, o cineol foi mais atrativo com 43.85% (132 indivíduos). Para os microambientes (sítios), o eugenol foi à essência mais atrativa com 10.75% ($n = 63$ indivíduos) no sítio NA_P e 9.55% ($n = 59$ indivíduos) no sítio RE_P . Cineol atraiu a maior abundância em AD_S (11.77%, $n = 69$ indivíduos), seguido por NR_P (6.82%, $n = 40$ indivíduos), IM_S (5.46%, $n = 32$ indivíduos) e IN_S (5.29%, $n = 31$ indivíduos). Salicilato de metila foi a menos atrativa com 0.17% ($n = 1$ indivíduo) em IN_S e nenhum indivíduo em NA_P (Figura 11).

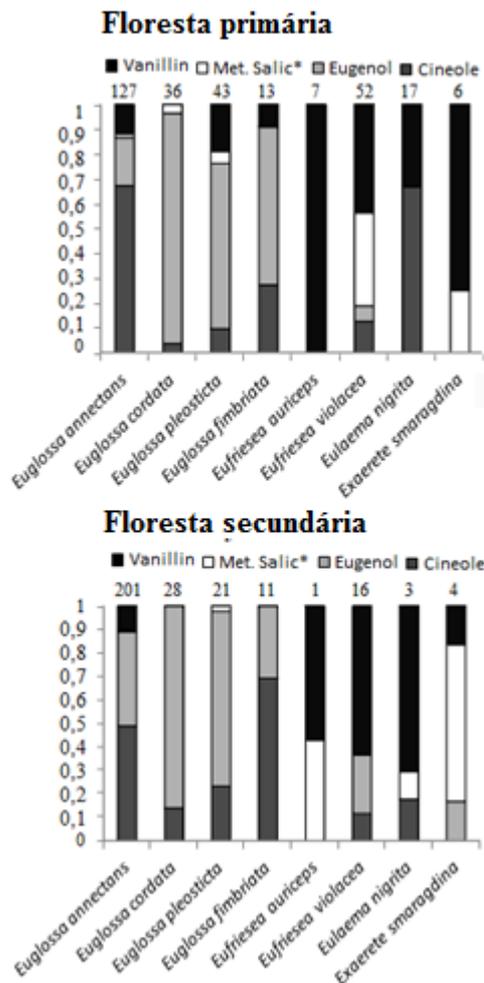


Figura 11. Frequência de machos de abelhas Euglossini capturados com diferentes essências químicas (cineol, eugenol, salicilato de metila e vanilina) dentro dos fragmentos de Mata Atlântica primária e secundária no Estado do Paraná, Brasil. *Salicilato de metila.

A atratividade das essências foi significativamente diferente para a riqueza de espécies ($df = 3, F = 11.51, p = 3.84e-07$) e diversidade ($df = 3, F = 6.043, p = 0.000531$), mas não foi diferente para a abundância ($df = 3, F = 0.9479, p = 0.4203$). Observamos aqui que as essências apresentam um padrão de atração para os gêneros de Euglossini, sendo que 89.79% do total de indivíduos de *Euglossa* foram atraídos por eugenol e cineol, enquanto que 73.58% do total de indivíduos de *Eufriesea*, *Eulaema* e *Exaerete* foram atraídos por salicilato de metila e vanilina. Além disso, as essências que atraíram mais espécies foram salicilato de metila e vanilina com sete espécies cada, seguido por cineol e eugenol que atraíram seis espécies cada.

Discussão

Nossas análises mostraram que a composição de espécies, a abundância e os índices de diversidade não diferiram entre os fragmentos de floresta primária e secundária. Interessantemente, os microambientes da floresta primária e secundária parecem influenciar a preferência das espécies por sítios conservados ou alterados. Recentemente, Ferronato et al. (2017) investigaram a comunidade de Euglossini em florestas nativas e restauradas e observaram que algumas espécies de abelhas das orquídeas parecem indicar a melhor qualidade do habitat, além da possível reintegração da comunidade de abelhas das florestas restauradas sendo favorecida pela mata nativa. Embora estudos comparando a riqueza e abundância de Euglossini entre vários fragmentos de florestas não sejam recentes (Sofia et al. 2004; Aguiar et al. 2014; Gonçalves et al. 2014; Giangarelli et al. 2015; Ferronato et al. 2017), pouco se sabe sobre a distribuição dessas espécies em microambientes, principalmente comparando o mosaico de microambientes dentro da floresta primária e secundária e se a distribuição das espécies afeta a atratividade das essências nesses diferentes microambientes.

Alguns estudos sugerem um efeito negativo sobre a comunidade de Euglossini em habitats fragmentados (Sofia et al. 2004; Aguiar et al. 2014; Gonçalves et al. 2014; Giangarelli et al. 2015), entretanto, nossos resultados sugerem que habitats fragmentados em processo de regeneração podem apoiar a reintegração da comunidade de abelhas das orquídeas, como sugerido por Ferronato et al. (2017) para as áreas de florestas reflorestadas. Uma possível evidência para esse fato é a presença de *Ef. violacea* em microambientes da floresta primária e secundária, sendo mais predominante na floresta em regeneração (secundária). Essa espécie foi sugerida como sensível à redução do tamanho dos fragmentos em estudos envolvendo pequenas áreas abertas ou bosques verdes e grandes florestas (Sofia & Suzuki 2004; Giangarelli et al. 2009). Nossos resultados parecem indicar que essa espécie de Euglossini pode ser pouco sensível à fragmentação. Este resultado poderia ser explicado pela proximidade do fragmento de floresta secundária à floresta primária, e que os microambientes contínuos entre floresta primária e secundária não podem afetar adversamente a dinâmica de forrageamento dessas espécies de abelhas. Vale ressaltar que os resultados devem ser interpretados com cautela, principalmente devido à pequena distância geográfica entre os fragmentos amostrados.

A frequência e abundância de todas as espécies de Euglossini foram maiores na floresta secundária, exceto *Eg. annectans* que predominou na floresta primária. Um fator que

pode proporcionar efeitos diferenciados na atração de abelhas das orquídeas é a volatilização do aroma de cada composto (Silva & Rebêlo 2002). As abelhas em geral, podem usar o aroma como veículo principal para encontrar recursos. Assim, se o fluxo de ar é mais forte em áreas abertas do que dentro das florestas, o aroma pode ser disperso mais facilmente na floresta secundária (em regeneração) do que dentro da floresta primária. Embora achados semelhantes em diferentes ambientes e estudos anteriores forneçam informações neste tópico (Raw 1989; Milet-Pinheiro & Schlindwein 2005; Némesio & Silveira 2006), um experimento direcionado para entender o efeito do fluxo na atração de abelhas das orquídeas nesses tipos de floresta ainda está em falta. Também, fatores como velocidade do vento, temperatura do ar e direção do vento podem ajustar diferentes concentrações e velocidade de dispersão de odores (Murlis et al. 1992), pois a densidade entre bosques verdes e florestas é diferente (Raw 1989; Némesio & Silveira 2006). Quanto à predominância de *Eg. annectans* na floresta primária, os resultados encontrados neste estudo corroboram com os estudos de Knoll & Penatti (2012) e Ferronato et al. (2017) sugerindo que a distribuição da espécie pode estar relacionada às regiões mais úmidas e preservadas da Mata Atlântica.

Por outro lado, *Eg. cordata*, *Eg. pleosticta*, *Ef. violacea* e *El. nigrita* foram mais abundantes e ocorreram mais frequentemente na floresta secundária, o que pode ser devido a respostas a micro fatores com poucas variações em florestas primárias (como temperatura, incidência de luz e umidade relativa) (Némesio & Silveira 2006). *Eufriesea violacea* foi claramente predominante na floresta secundária, embora esse fragmento tenha sido alterado e esteja em processo de regeneração natural, a preferência da espécie neste fragmento pode sugerir qualidade ambiental na recuperação florestal, como proposto por Giangarelli et al. (2009). O número de *Ef. auriceps* registrado neste estudo foi superior aos encontrados em outros estudos no Estado do Paraná (Santos & Sofia 2002; Sofia et al. 2004; Gonçalves et al. 2014), assumindo que as condições mais preservadas da floresta primária podem favorecer a regeneração da floresta secundária neste estudo, influenciando o reequilíbrio ecológico da comunidade de Euglossini, e esta condição poderia explicar o registro de *Ef. auriceps*, além de destacar a importância da preservação de pequenos fragmentos para a comunidade de Euglossini (Aguiar & Ganglianone 2012; Botsch et al. 2017; Ferronato et al. 2017).

Têm sido sugerido que algumas espécies são indicadores de ambientes perturbados, como *Eg. cordata* e *El. nigrita* (Rebêlo & Cabral 1997; Peruquetti et al. 1999; Silva & Rebêlo 2002). No entanto, nossos dados confirmam que as florestas em regeneração são importantes para as comunidades de Euglossini e pode ter um efeito na micro distribuição (e talvez no

comportamento de forrageamento). Os dados atuais não são congruentes que as espécies *Eg. cordata* e *El. nigrita* são indicadoras de floresta perturbada neste estudo, como enfatizado por Ramalho et al. (2009) e Aguiar & Ganglianone (2012), apesar de sua tolerância à floresta perturbada ser evidente (Santos & Sofia 2002; Matozzo et al. 2011; Aguiar & Ganglianone 2012; Nemésio 2013; Giangarelli et al. 2015; Mateus et al. 2015; Ferronato et al. 2017; Medeiros et al. 2017).

Essa reflexão remete à seguinte questão: os diferentes graus de regeneração de microambientes em florestas contínuas não alteram a comunidade de abelhas das orquídeas ou alteram a tal ponto que afetam o equilíbrio da comunidade nos sítios conservados da floresta primária? *Euglossa annectans* foi a espécie mais abundante nos sítios preservados e esteve presente durante 11 meses na floresta secundária. Estes resultados representam a preferência da espécie por sítios mais conservados (como florestas primárias), e ainda, a contínua frequência da espécie na floresta secundária poderia indicar a possível reintegração da comunidade de Euglossini em microambientes contínuos, tendo em vista o potencial de *Eg. annectans* para atuar como bioindicadora de habitats conservados ou com maior sucesso na recuperação ou regeneração florestal (Mattozo et al. 2011; Aguiar & Ganglianone 2012; Knoll & Penatti 2012; Ferronato et al. 2017). Também, os microambientes menos preservados apresentaram menor abundância dessa espécie, o que sugere algumas restrições a esses locais, ou que as espécies de Euglossini respondem diferentemente às características locais dos microambientes (Moreira et al. 2015). Como os machos de Euglossini realizam seus voos de acasalamento em espaços abertos iluminados pelo sol (Stern 1991), esse seria outro fator que poderia ter contribuído para a maior uniformidade das assembleias de espécies (exceto *Eg. annectans*) nos sítios de microambientes contínuos menos conservados de florestas primárias e secundárias (RE_P, AD_S, IM_S e IN_S).

Quando comparamos os microambientes amostrados dentro dos dois tipos de florestas, observamos que os índices de diversidade e uniformidade de espécies são diferentes entre os microambientes, isso pode ocorrer porque algumas espécies de Euglossini requerem diferentes habitats para atender suas necessidades específicas de forrageamento e nidificação (Roubik 1989; Roubik & Hanson 2004). Embora as investigações envolvendo a distância de voo de Euglossini não sejam conclusivas (Dressler 1982; Pokorny et al. 2014), a grande capacidade de voo de algumas espécies de abelhas das orquídeas é evidente (Janzen 1971; Wikelski et al. 2010; Nemésio 2012). Esse potencial de voo de longo alcance pode ter contribuído para a presença de quase todas as espécies nos microambientes, o que pode estar

promovendo o fluxo de pólen entre áreas não perturbadas e perturbadas e, assim, contribuir para a regeneração florestal (Gathmann & Tschardt 2002; Jha & Dick 2010).

A ocorrência de *Euglossini* nos microambientes contínuos pode ser interpretada como uma possibilidade de fluxo gênico entre plantas dos diferentes microambientes, considerando o potencial de polinização das abelhas das orquídeas, que são responsáveis pela polinização de uma grande variedade de espécies de Orchidaceae e muitas espécies vegetais de outras famílias botânicas (Dressler 1982; Cameron 2004; Roubik & Hanson 2004), e provavelmente pode estar envolvido no sucesso do processo de regeneração que favorece a restauração florestal e a manutenção do sistema ecológico (Ferronato et al. 2017).

O papel dos aromas

É comum o uso de iscas aromáticas em estudos realizados para atrair os machos de abelhas *Euglossini* (Sofia & Suzuki 2004; Silveira et al. 2011; Gonçalves et al. 2014; Giangarelli et al. 2015). Armadilhas com aromas expostas por curtos períodos é o método mais utilizado (Aguilar & Gangliano 2008; Silveira et al. 2011; Gonçalves et al. 2014; Giangarelli et al. 2015; Oliveira-Junior et al. 2015), entretanto, o método que usamos foi o de armadilhas expostas por longo período (8640 horas/12 meses), a fim de maximizar a eficiência da amostragem de campo. De acordo com Storck-Tonon et al. (2013), pesquisas sobre a fauna de *Euglossini* requer um esforço de amostragem eficiente para melhores estimativas da riqueza de espécies, incluindo as espécies raras. Nesta perspectiva, destacamos que mesmo a volatilidade sendo um fator importante na atratividade dos indivíduos, o método que usamos (longo período) apresentou como ponto positivo a eficiência no esforço de amostragem (99.78) e a estimativa de riqueza na floresta primária (8 spp.) e secundária (8 spp.) perto do ideal (8.01 spp.), este fato significa que a maioria das espécies sensíveis as quatro essências utilizadas neste estudo foram amostradas, talvez ocorrendo uma espécie muito rara ou algumas espécies que estão de passagem pelos ambientes da floresta, atendendo assim a um método de amostragem eficiente que não é comumente empregado.

Em relação à atratividade das essências, constatamos que há uma complementaridade dos aromas utilizados e os gêneros de *Euglossini* atraídos. O cineol e eugenol atraíram aproximadamente 90% do total das espécies de *Euglossa* amostradas, e salicilato de metila e a vanilina atraíram aproximadamente 75% dos indivíduos de *Eufriesea*, *Eulaema* e *Exaerete*. Este resultado mostra que a variedade de essências escolhidas pode afetar a diversidade de

espécies de Euglossini amostradas. Portanto, ressaltamos a importância de avaliar com cautela a preferência dos compostos químicos por Euglossini, uma vez que múltiplos fatores, além das essências, podem afetar a atratividade das abelhas (Stern 1991; Murlis et al. 1992; Nemesio & Silveira 2006; Oliveira-Junior et al. 2015).

Nossos resultados sugerem que microambientes contínuos estariam favorecendo a reintegração da comunidade de Euglossini nas florestas em regeneração (secundária) próxima às florestas primárias. Apesar do efeito temporal e da composição da fauna de Euglossini em diferentes microambientes, as florestas primárias e secundárias não parecem ter efeito sobre a variação temporal e riqueza de espécies. Outro ponto é a complementaridade das essências na atratividade dos gêneros de Euglossini, visando que a escolha do composto pode influenciar a composição e abundância das espécies. Embora estudos anteriores tenham focado sobre as respostas das abelhas das orquídeas à diversidade de habitats e regiões (Aguiar & Ganglianone 2012; Aguiar et al. 2014; Cordeiro et al. 2012; Gonçalves et al. 2014; Giangarelli et al. 2015; Botsch et al. 2017; Ferronato et al. 2017), poucos estudos até agora investigaram como os microambientes afetam a estrutura e as respostas dessas abelhas às características locais (Abrahamczyk et al. 2011). Fragmentos de florestas são geralmente pequenos e isolados (Ribeiro et al. 2009), e nos centros urbanos são restritos a áreas verdes, com diferentes extensões que podem afetar as respostas de Euglossini à estrutura da floresta desses ambientes (Ferreira et al. 2013), entretanto os resultados apresentados indicam que microambientes contínuos podem favorecer a uniformidade e reintegração das abelhas das orquídeas, por isso sugerimos que esses fatos sejam considerados em ações futuras de conservação e recuperação.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Dr. Yzel Suárez Rondon por sua ajuda com os cálculos estatísticos e ao Dr. Josué Raizer pela ajuda nas análises, gráficos e dúvidas estatísticas. Agradecemos também Veridiana Araújo Alves da Costa Pereira, Rodolfo Rubik, Jorge Borges dos Santos, Edson Zanlorensi e Jarbas Aguinaldo Teixeira pela assistência nas coletas de campo. Agradecemos ao Refúgio Biológico Bela Vista (Itaipu Binacional) pelo fornecimento de transporte para os sítios de amostragem e pelos materiais de estudo, assim como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pelo fornecimento de

materiais de estudo e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio-System) pela permissão concedida para a realização das coletas do material biológico.

Contribuição dos autores

AI Sobreiro, LLS Peres e VV Alves-Junior: desenho experimental. AI Sobreiro e LLS Peres: trabalho de campo e coleta dos dados. AI Sobreiro: análise dos dados. AI Sobreiro, LLS Peres, SV Boff, JR Amaral e VV Alves-Junior: escrita do manuscrito. SV Boff: revisão constante do manuscrito com alterações importantes.

Referências

- Abrahamczyk, S., Gottleuber, P., Matauschek, C. & Kessler, M. (2011). Diversity and community composition of euglossine bee assemblages (Hymenoptera: Apidae) in western Amazonia. *Biodivers Conservation*, 20(13): 2981-3001. doi: doi.org/10.5167/uzh-51433
- Aguiar, W.M. & Gaglianone, M.C. (2008). Comunidade de Abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em Remanescentes de Mata Estacional Semidecidual sobre Tabuleiro no Estado do Rio de Janeiro. *Neotropical Entomology*, 37(2): 118-125. doi: 10.1590/S1519-566X2008000200002
- Aguiar, W.M. & Gaglianone, M.C. (2012). Euglossini bee communities in small forest fragments of the Atlantic Forest, Rio de Janeiro state, southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 56(2): 210-219. doi:10.1590/S0085-56262012005000018
- Aguiar, W.M., Melo, G.A.R. & Gaglianone, M.C. (2014). Does Forest Physiognomy affect the Structure of Orchid Bee (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) Communities? A Study in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro State, Brazil. *Sociobiology*, 61(1): 68-77. doi: 10.13102/sociobiology.v61i1.68-77
- Boff S., Soro A., Paxton R.J. & Alves-dos-Santos I. (2014). Island isolation reduces genetic diversity and connectivity but does not significantly elevate diploid male production in a neotropical orchid bee. *Conservation Genetics*, 15: 1123-1135. doi:10.1007/s10592-014-0605-0)

- Boscolo, D., Tokumoto, P.M., Ferreria, P.A., Ribeiro, J.W. & Santos, J.S. (2017). Positive responses of flower visiting bees to landscape heterogeneity depend on functional connectivity levels. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 15: 18-24. doi:10.1016/j.pecon.2017.03.002.
- Botsch, J.C., Walter, S.T., Karubian, J., González, N., González, E.K. & Brosi, B.J. (2017). Impacts of forest fragmentation on orchid bee (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) communities in the Chocó biodiversity hotspot of northwest Ecuador. *Journal of Insect Conservation*, 21(4): 633-643. doi: 10.1007/s10841-017-0006-z
- Brasil. (1994). Define formações vegetais primárias e estágios sucessionais de vegetação secundária. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente, CONAMA. Resolução CONAMA nº2, de 18 de março de 1994. – In: Resoluções, 1994. Retrived from:<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res94/res0294.html> (accessed 29 November 2016).
- Brasil. (2009). Caderno de Licenciamento Ambiental. Programa Nacional de Capacitação de gestores ambientais: licenciamento ambiental / Ministério do Meio Ambiente. – Brasília: MMA, 2009.
- Brasil. (2010a). Mata Atlântica Manual de Adequação Ambiental. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Departamento de Conservação da Biodiversidade Núcleo Mata Atlântica e Pampa. Brasília: MMA/SBF, 2010.
- Brasil. (2010b). Florestas do Brasil em resumo – 2010: dados de 2005-2010. Serviço de Florestal Brasileiro – Brasília: SFB, 2010.
- Cameron, S.A. 2004. Phylogeny and biology of neotropical orchid bees (Euglossini). *Annual Review Entomology*, 49(107): 377–404. doi: 10.1146/annurev.ento.49.072103.115855
- Campos, L.A.C., Silveira, F.A., Oliveira, M.L., Abrantes, C.V.M., Morato, E.F. & Melo, G.A.R. (1989). Utilização de armadilhas para a captura de machos de Euglossini (Hymenoptera, Apoidea). *Revista Brasileira de Zoologia*, 6(4): 621-626. doi: 10.1590/S0101-81751989000400008
- Cerântola N.C.M., Oi, C.A., Cervini, M. & Del Lama, M.A. (2010). Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* Linnaeus 1758 from the state of São Paulo, Brazil. *Apidologie*, 42(2):214–222. doi:10.1051/apido/2010055
- Clements, F.E. (1916). *Plant succession: an analysis of the development of vegetation*. Carnegie Institute of Washington, No. 242, USA. doi:10.5962/bhl.title.56234

- Cordeiro, G.D., Boff, S., Caetano, T.A., Fernandes, P.C. & Alves-dos-Santos, I. (2012). Euglossini bees (Apidae) in Atlantic forest areas of São Paulo state Southeastern Brazil. *Apidologie*, 44, 254-267. doi: 10.1007/s13592-012-0176-3
- Dambros, C. (2014): poncho.R. figshare. Code. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.753347.v3>
- Doson, C.H., Dreller, R.L., Hills, H.G., Adams, R.M. & Williams, N.H. 1969. Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science*, Washington, 164(13):1243-1249. doi: 10.1126/science.164.3885.1243
- Dressler, R.L. (1982). Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13: 373-394. doi:10.1146/annurev.es.13.110182.002105
- Eltz, T., Bause, C., Hund, K., Quezada-Euan, J.J.G. & Pokorny, T. (2015). Correlates of perfume load in male orchid bees. *Chemoecology*, 25(4): 193-199. doi: 10.1007/s00049-015-0190-9
- Ferreira, R.P., Martins, C., Dutra, M.C., Mentone, C.B. & Antonini, Y. (2013). Old Fragments of Forest Inside an Urban Area Are Able to Keep Orchid Bee (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) Assemblages? The Case of a Brazilian Historical City. *Neotrop Entomol*, 42:466-473. doi: 10.1007/s13744-013-0145-1
- Ferronato, M.C.F., Giangarelli, D.C., Mazzaro, D., Uemura, N. & Sofia, S.H. (2017). Orchid Bee (Apidae: Euglossini) Communities in Atlantic Forest Remnants and Restored areas in Paraná State, Brazil. *Neotropical Entomology*, 47(3) 352-361. doi: 10.1007/s13744-017-0530-2
- Fischer, L.K., Eichfeld, J., Kowarik, J. & Buchholz, S. (2016). Disentangling urban habitat and matrix effects on wild bee species. *Peer J*, 4:e2729. doi: 10.7717/peerj.2729
- Fisher, R.A., Corbet, A.S. & Williams, C.B. (1943). The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of animal population. *Journal of Animal Ecology*, 12: 42-58.
- Gathmann, A. & Tschardtke, T. (2002). Foraging ranges of solitary bees. *Journal of Animal Ecology*, 71, 757-764. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2002.00641.x>
- 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: 71-83. doi: I: 10.1007/s13592-014-0303-4

- 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. *Neotropical Entomology*, 38(5): 610-615. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2009000500008>
- Giannini, T.C., Garibaldi, L.A., Acosta, A.T., Silva, J.S., Maia, K.P., Saraiva, A.M., Guimarães Jr, P.R. & Kleinert, A.M.P. (2015). Native and Non-Native Supergeneralist Bee Species Have Different Effects on Plant-Bee Networks. *PLoS ONE*10(9): e0137198. doi:10.1371/journal.pone.0137198
- Gonçalves, R.B., Scherer, V.L. & Oliveira, O.S. (2014). The orchid bees (Hymenoptera, Apidae, Euglossina) in a forest fragment from western Paraná state, Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 54(6): 63-68. doi: 10.1590/0031-1049.2014.54.06
- Google Earth-maps. Retrived from: <http://mapas.google.com>. (Acessed on 22 September 2017).
- Griswold T., Herndon J.D. & Gonzalez V.H. (2015). First record of the orchid bee genus *Eufriesea* Cockerell (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) in the United States. *Zootaxa*, 3957(3)342-6. doi: 10.11646/zootaxa.3957.3.7.
- Hansen, M.C., Potapov, P.V., Moore, R., Hancher, M., Turubanova, S.A., Tyukavina, A., Thau, D., Stehman, S.V., Goetz, S.J., Loveland, T.R., Kommareddy, A., Egorov, A., Chini, L., Justice, C.O. & Townshend, J.R.C. (2013). High-resolution global maps of 21st-century forest cover change. *Science*, 342(660): 850–853. doi: 10.1126/science.1244693.
- Hurlbert, S.H. (1971). The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology*, 52, 577–586. doi: doi.org/10.2307/1934145
- IBAMA. (1991). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. PORTARIA N.º 83-N, DE 26 DE SETEMBRO DE 1991 - In: Resoluções, 1991. Retrived from:http://www.mp.go.gov.br/nat_sucroalcooleiro/Documentos/legislacao/Geral/florestas/flo10. (Accessed on 05 September 2016).
- ITAIPU BINACIONAL. (1978). Inventário Florestal da região de influência da represa Itaipu. Curitiba: Itaipu Binacional. Retrived from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000176&pid=S1414-753X201400010000500013&lng=en
- Janzen, D.H. (1971). Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science*, 171(3967): 203–205. doi:10.1126/science.171.3967.203

- Jha, S. & Dick, C.W. (2010). Native bees mediate long-distance pollen dispersal in a shade coffee landscape mosaic. *PNAS*, 107(31): 13760-13764. doi: [http://doi/10.1073/pnas.1002490107](http://doi.org/10.1073/pnas.1002490107)
- Knoll, F.R.N. & Penatti, N.C. (2012). Habitat fragmentation effects on the orchid bee communities in remnant forests of southeastern Brazil. *Neotropical Entomology*, 41: 355–365. doi: [10.1007/s13744-012-0057-5](http://doi.org/10.1007/s13744-012-0057-5)
- Magurran, A.E. (2004). *Measuring biological diversity*. Blackwell Publishing company, Oxford, 256 p.
- Mateus, S., Andrade-Silva, A.C.R. & Garófalo, C.A. (2015). Diversity and Temporal Variation in the Orchid Bee Community (Hymenoptera: Apidae) of a Remnant of a Neotropical Seasonal Semi-deciduous Forest. *Sociobiology*, 62(4): 571-577. doi: [10.13102/sociobiology.v62i4.391](http://doi.org/10.13102/sociobiology.v62i4.391)
- Matozzo, 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. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 51(33): 505-515. doi: [10.1590/S0031-10492011003300001](http://doi.org/10.1590/S0031-10492011003300001)
- McCravy, K.W., Dyke, J.V., Creedy, T.J. & Roubik, D.W. (2016). Orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) of Cusuco National Park, State of Cortés, Honduras. *Florida Entomologist*, 99(4): 765-768. doi: [10.1653/024.099.0431](http://doi.org/10.1653/024.099.0431)
- Medeiros, R.L.S., Aguiar, W.M., Aguiar, C.M.L. & Borges, I.G.M. (2017). The Orchid Bee Communities in different phytophysionomies in the Atlantic Forest: from lowland to montane rainforests. *Sociobiology*, 64(2): 182-190. doi: [10.13102/sociobiology.v64i2.1348](http://doi.org/10.13102/sociobiology.v64i2.1348)
- Melo, A.S. (2008). O que ganhamos ‘confundindo’ riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? *Biota Neotropica*, 8(3): 021-027
- Milet-Pinheiro, P. & Schlinweln, C. (2005). Do euglossini males (Apidae, Euglossini) leave tropical rainforest to collect fragrances in sugarcane monocultures? *Revista Brasileira de Zoologia* 22(4): 853-858. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752005000400008>
- Moure, J. S.; Urban, D.; Melo, G.A.R. Catalogue of bees (Hymenoptera: Apidae) in the neotropical region. 2012. Disponível em: < <http://moure.cria.org.br/>>. Acessado em 15 de Junho de 2017.

- Morato, E.F. (1994). Abundância e riqueza de machos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em mata de terra firme e áreas de derrubada, nas vizinhanças de Manaus (Brasil). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Zoologia*, 10(1): 95-105.
- Moreira, E.F., Boscolo, D. & Viana, B.F. (2015). Spatial Heterogeneity Regulates Plant-Pollinator Networks across Multiple Landscape Scales. *PLOS ONE*, 10(4): e0123628. doi:10.1371/journal.pone.0123628
- Murlis, J., Elkinton, J.S. & Cardé, R.T. (1992). Odor plumes and how insect use them. *Annual Review Entomology*, 37: 505-532. doi: 10.1146/annurev.en.37.010192.002445
- Neame, L.A., Griswold, T. & Elle, E.B. (2012). Pollinator nesting guilds respond differently to urban habitat fragmentation in an oak-savannah ecosystem. *Insect Conservation and Diversity*, 6(1):56-66. doi: 10.1111/j.1752-4598.2012.00187.x
- Nemésio, A. & Silveira, F.A. (2006). Edge Effects on the Orchid-Bee Fauna (Hymenoptera: Apidae) at a Large Remnant of Atlantic Rain Forest in Southeastern Brazil. *Neotropical Entomology*, 35(3): 313-323. doi: 10.1590/S1519-566X2006000300004
- Nemésio, A. (2009). Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest. *Zootaxa*, Auckland. 2041: 1–242.
- Nemésio, A. (2012). Methodological concerns and challenges in ecological studies with orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossina). *Bioscience Journal*, 28: 118–135.
- Nemésio, A. (2013). Are orchid bees at risk? First comparative survey suggests declining populations of forest-dependent species. *Brazilian Journal of Biology*, 73(2): 367-374. doi. 10.1590/S1519-69842013000200017
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Henry M., Stevens, H., Szoecs E. & Wagner, H. (2018). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.4-6. . Retrieved from: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (Accessed 01 August 2017).
- Oliveira, R., Pinto, C.E. & Schlindwein, C. (2015). Two common species dominate the species-rich Euglossini bee fauna of an Atlantic Rainforest remnant in Pernambuco, Brazil. *Brazilian Journal Biology*, 75(4): 1-8. doi.org/10.1590/1519-6984.18513.
- Oliveira-Junior, J.M.B., Almeida, S.M., Rodrigues, L., Silvério-Júnior, A.J. & Anjos-Silva, E.J. (2015). Orchid bees (Apidae: Euglossini) in a forest fragment in the ecotone cerrado-amazonian forest, Brazil. *Acta Biologica Colombiana*, 20(3): 67-78. doi: 10.15446/abc.v20n3.41122

- Pemberton, R.W. & Wheeler, G.S. (2006). Orchid bees don't need orchids evidence from the naturalization of an orchid bee in Florida. *Ecology*, 87(8): 1995-2001. doi: [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[1995:OBDNOE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[1995:OBDNOE]2.0.CO;2)
- Peruquetti, R.C., Campo, L.A.O., Coelho, C.D.P., Abrantes, C.V.M. & Lisboa, L.C.O. (1999). Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16(2): 101-118. doi: 10.1590/S0101-81751999000600012
- Pokorny, T., Loose, D., Dyker, G., Javier, J., Quezada-Euán, J.J.G. & Eltz, T. (2014). Dispersal ability of male orchid bees and direct evidence for long-range flights. *Apidologie*, 46: 224-237. doi: 10.1007/s13592-014-0317-y
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- R Development Core Team (2013). R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- 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. *Revista Brasileira de Entomologia*, 53(1): 95-101. doi: 10.1590/S0085-56262009000100022
- Ramírez, S., Dressler, R.L. & Ospina, M. (2002). Abejas euglossinas (Hymenoptera: Apidae) de la Región Neotropical: Listado de especies con notas sobre su biología. *Biota Colombiana*, 3(1): 7-118.
- Raw, A. (1989). The dispersal of Euglossini bees between isolated patches of eastern Brazilian wet forest (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomol*, 33(1): 103-107.
- Rebêlo, J.M.M. & Cabral, A.J. (1997). Espécies de Euglossinae (Hymenoptera, Apidae) de Barreirinhas, Zona do Litoral da Baixada Oriental Maranhense. *Acta Amazônica*, 27(2): 145-152.
- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F. & Hirota, M.M. (2009). The Brazilian Atlantic Forest: How much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142(6): 1141–1153. doi: 10.1016/j.biocon.2009.02.021
- Roubik, D.W. & Hanson, P.E. (2004). Orchids bees of Tropical America: Biology and Field Guide. Instituto Nacional de Biodiversidade [INBio], Santo Domingo de Heredia, Costa Rica, 352pp.

- Roubik, D.W. (1989). Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge University Press, New York, 514pp. doi: 10.1126/science.248.4958.1026
- Santos, A.M. & Sofia, S.H. (2002). Horário de atividade de machos de Euglossinae (Hymenoptera, Apidae) em um fragmento de floresta semidecídua no Norte do Estado do Paraná. *Acta Scientiarum*, 24(2): 375-381. doi: 10.4025/actasciobiolsci.v24i0.2297
- Silva, F.S. & Rebêlo, J.M.M. (2002). Population dynamics of Euglossinae bees (Hymenoptera, Apidae) in an early second-growth forest of Cajual island, in the State of Maranhão. *Brazilian Journal of Biology*, 62(1): 15-23. doi:10.1590/S1519-69842002000100003
- Silveira, G.C., Nascimento, A.M., Sofia, S.H. & Augusto, S.C. (2011). Diversity of the Euglossini bee community (Hymenoptera, Apidae) of an Atlantic Forest remnant in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 55(1): 109-115. doi: 10.1590/S0085-56262011000100017
- Skov, C. & J. Wiley. 2005. Establishment of the neotropical orchid bee *Euglossa viridissima* (Hymenoptera: Apidae) in Florida. *Florida Entomologist*, 88: 225-227. doi: 10.1653/0015-4040(2005)088[0225:EOTNOB]2.0.CO;2
- Sofia, S.H. & Suzuki, K.M. (2004). Comunidades de Machos de Abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em Fragmentos Florestais do Sul do Brasil. *Neotropical Entomology*, 33(6): 693-702. doi: 10.1590/S1519-566X2004000600006.
- Sofia, S.H., Santos, A.M. & Silva, C.R.M. (2004). Euglossini bees (Hymenoptera, Apidae) in a remnant of Atlantic Forest in Paraná State, Brazil. *Iheringia Série Zoologia*, 94(2): 217-222. doi: 10.1590/S0073-47212004000200015
- Soro, A., Quezada-Euan, J.J.G., Theodorou, P., Mortiz, R.F.A. & Paxton, R.J. (2016). The population genetics of two orchid high dispersal, low diploid male production and only na effect of island isolation in lowering genetic diversity. *Conservation Genetics*, 18(3): 607-619. doi: 10.1007/s10592-016-0912-8
- Stern, D.L. (1991). Male territoriality and alternative male behaviors in the Euglossini bee, *Eulaema meriana* (Hymenoptera: Apidae). *J. Kansas. Entomological Society*, 64(4): 421-437.
- Storck-Tonon, D., Morato, E.F., Melo, A.W.F. & Oliveira, M.L. (2013). Orchid Bees of forest fragments in Southwestern Amazonia. *Biota Neotropica*, 13(1):133-141. doi: 10.1590/S1676-06032013000100015

- Wikelski M., Moxley J., Eaton-Mordas A., López-Uribe M.M., Holland R., Moskowicz D. & Roubik D.W., Kays R. (2010). Large-range movements of neotropical orchid bees observed via radio telemetry. PLoS ONE, 5(5):5–10. doi: 10.1371/journal.pone.0010738
- Ziober, B.R. & Zanirato, S.H. (2014). Ações para a salvaguarda da biodiversidade na construção da usina hidrelétrica Itaipu Binacional. Ambiente & Sociedade, 17(1): 59-75. Retrived from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414-753X2014000100005

Diversidade de abelhas nativas



Capítulo 2

Influência da regeneração florestal para a diversidade de abelhas

Resumo

Mudanças na estrutura e na fragmentação das florestas podem causar a perda da diversidade de abelhas, afetando as relações ecológicas entre plantas-polinizadores, impactando o equilíbrio dos ecossistemas. Esses importantes polinizadores dependem de recursos florais saudáveis e de habitats preservados para sua sobrevivência. Os efeitos da regeneração florestal nas comunidades de abelhas ainda são pouco conhecidos. Registramos as frequências de abelhas que visitam as flores em fragmento de floresta madura (primária) e em regeneração (secundária) da Mata Atlântica. Avaliamos se a complexidade do habitat afeta: (i) a variação sazonal das abelhas silvestres (e *Apis mellifera*); (ii) os índices de diversidade das comunidades de abelhas; (iii) a diversidade e preferência dos recursos florais, e (iv) a abundância de *Apis mellifera* e a preferência floral. Descobrimos que as comunidades de abelhas são semelhantes entre os fragmentos florestais e a ocorrência de plantas generalistas influencia a maior abundância de abelhas, embora a diversidade de plantas seja essencial para a riqueza de abelhas. A regeneração natural de áreas localizadas próximas a remanescentes florestais pode servir como medidas de conservação atraentes e reintegrar o equilíbrio da comunidade desses polinizadores essenciais.

Palavras-chave: Floresta secundária, Remanescente florestal, Mata Atlântica, plantas nativas, polinizadores, visitantes florais.

Abstract

Changes in the structure and the fragmentation of forests can cause loss of bee species, affecting ecological relations between plant-pollinator, impacting the balance of ecosystems. These important pollinators are dependent on healthy floral resources and preserved habitats for their survival. The effects of forest regeneration on bee communities are still poorly understood. We recorded the frequencies of flower-visiting bees in mature (primary) and regeneration (secondary) forest fragments of Atlantic Forest and evaluated whether habitat complexity affects: (i) the seasonal variation of wild bees (and *Apis mellifera*); (ii) the diversity indexes of bee communities; (iii) the diversity and preference of floral resources, and (iv) the abundance of *Apis mellifera* and the use of floral resources. We found that bee communities are similar between the forest fragments studied here and the occurrence of generalist plants influences greater bee abundance, although plant diversity is essential for bee richness. Natural regeneration of areas located near forest remnants can serve as attractive conservation measures and reintegrate the community balance of these essential pollinators.

Keywords: Secondary forest; forest remnants; Atlantic Forest; native plants; pollination; floral visitors.

Introdução

Mudanças nos habitats naturais causados por atividades antrópicas estão entre os principais propulsores da perda da biodiversidade mundial (Tabarelli et al. 2010; Ferronato et al. 2017). Projetos de conservação e recuperação ambiental ainda são escassos perto do impacto causado pela perda e fragmentação de habitats (Scaven & Rafferty 2013; Ferronato et al. 2017). Por essa razão, pesquisas que entendam a estrutura e a dinâmica populacional da fauna e flora nas florestas em regeneração e recuperadas são importantes para sustentar ações de preservação da vida silvestre (Neame et al. 2013; Stangler et al. 2016).

Os insetos que visitam as flores são responsáveis pela maior parte do processo de polinização e dependem da disponibilidade de recursos florais saudáveis e de áreas florestais para nidificação e reprodução (Hagen et al. 2012; Fowler et al. 2016). Entre esses insetos, as abelhas visitam uma ampla diversidade de espécies de plantas e são polinizadores exclusivos de vários grupos botânicos (Scaven & Rafferty 2013; Venjakob et al. 2016). No entanto, as mudanças ambientais afetam significativamente as comunidades de abelhas (Scaven & Rafferty 2013; Stangler et al. 2016), embora alguns estudos indiquem a capacidade desses polinizadores de forragear recursos e habitar florestas cada vez mais fragmentadas e antropizadas (Neame et al. 2013; Botsch et al. 2017), é evidente os efeitos das mudanças ambientais nas comunidades de abelhas (Stangler et al. 2016; Venjakob et al. 2016; Salisbury et al. 2015) comprometendo os serviços de polinização e sobrevivência das abelhas (Hagen et al. 2012; Neame et al. 2013; Scaven & Rafferty 2013; Rubene et al. 2015; Xie et al. 2016).

O declínio percebido das abelhas no mundo (Neame et al. 2012; Otto et al. 2016; Koh et al. 2016; Aleixo et al. 2017; Boscolo et al. 2017) representa uma grave ameaça à biodiversidade e às atividades ecossistêmicas fornecidas por esses polinizadores (Venjakob et al. 2016). As áreas florestais cobrem 842 milhões de hectares na América do Sul, representando 27% da cobertura florestal mundial (FAO 2016). Reconhecida como uma das florestas mais ameaçadas do planeta: a Mata Atlântica (MA), representa 7.26% de sua cobertura original (BRASIL 2009), distribuídos em fragmentos pequenos (< 50 ha) e isolados no território brasileiro (Ribeiro et al. 2009). Considerado a potencial importância da MA para a preservação da biodiversidade de florestas tropicais e conservação das comunidades de abelhas, o bioma tem sido foco de ações de recuperação ou restauração (Nemésio & Silveira 2006; Giangarelli et al. 2015; Ferronato et al. 2017; Boscolo et al. 2017) na tentativa de minimizar os efeitos da alteração dos habitats a diversidade destes polinizadores essenciais.

Essa perda e fragmentação de florestas naturais têm graves consequências ao equilíbrio dos ecossistemas, afetando diretamente as relações ecológicas entre planta-polinizador (Neame et al. 2013; Fowler et al. 2016; Aleixo et al. 2017). De fato, essas relações mutualísticas são diretamente responsáveis pela manutenção e recuperação de habitats (Fowler et al. 2016; Venjakob et al. 2016; Ferronato et al. 2017), uma vez que várias plantas dependem dos serviços de polinização realizado pelas abelhas, bem como estes insetos necessitam de recursos alimentares saudáveis para sua sobrevivência (Morandin et al. 2013; Rubene et al. 2015; Fowler et al. 2016; Dar et al. 2017). Muitas abelhas são generalistas florais, visitam grande diversidade de plantas diariamente estando ativas por longos períodos, geralmente apresentam comportamento social, eussocial e algumas solitárias, enquanto algumas espécies são especialistas florais, possuem adaptações morfológicas associadas às especificações florais e normalmente com comportamento solitário (Michener 2007). Assim, estudos de monitoramento dos serviços ecossistêmicos realizados pelas abelhas em florestas recuperadas ou em regeneração podem ser úteis no entendimento das relações ecológicas existentes entre habitats que estão sendo recuperados, além de servirem como iniciativas importantes para o restabelecimento das populações de polinizadores.

Estudos sobre a diversidade regional e global descrevem os padrões de distribuição e diversidade de abelhas (Potts et al. 2010; Abrahamczyk et al. 2011; Roberts et al. 2017), e tem sido reconhecidos como medidas fundamentais para compreender os impactos das alterações climáticas e ambientais sobre as comunidades (Abrahamczyk et al. 2011; Ferronato et al. 2017; Roberts et al. 2017; Silva-Neto et al. 2017). No entanto, fatores específicos do ambiente influenciam a distribuição de espécies em escalas espacial e temporal (Abrahamczyk et al. 2011; Eltz et al. 2014; Koh et al. 2016; Aleixo et al. 2017). Percepções de escalas espaciais diferentes podem determinar padrões distintos de diversidade para o mesmo grupo taxonômico, não deixando claro o efeito das mudanças ambientais sobre as comunidades, por exemplo, estudos relatam que determinadas espécies são bioindicadoras de ambientes preservados (Némesio & Silveira 2006) e alterados (Giangarelli et al. 2009). O conhecimento sobre os efeitos da fragmentação florestal sobre a assembleia de abelhas é amplo (Tabarelli et al. 2010; Stangler et al. 2016; Boscolo et al. 2017; Ferronato et al. 2017; Silva-Neto et al. 2017), enquanto as informações sobre as diversidade local (alfa) e entre habitats (beta) das comunidades de abelhas silvestres em gradientes contínuos de floresta primária e secundária (em regeneração) ainda carecem na literatura.

Neste sentido, este estudo objetivou avaliar se a complexidade do habitat, floresta madura e secundária, afetam: (i) a variação sazonal das abelhas silvestres e *Apis mellifera*; (ii)

os índices de diversidade das comunidades de abelhas; (iii) a diversidade das plantas e abelhas visitantes, e (iv) a abundância de *Apis mellifera* e preferência floral. Assim sendo, investigamos a composição e abundância das espécies em habitats locais com diferentes estágios de conservação, para caracterizar as respostas da rápida perda de habitat sobre as comunidades de abelhas na preferência floral.

Materiais e Métodos

Área de estudo

O estudo foi realizado no município de Foz do Iguaçu (617,70 km²), oeste do estado do Paraná, Brasil (Figura 12), de outubro de 2013 à setembro de 2014. O trabalho de campo foi realizado no Refúgio Biológico Bela Vista (RBV) - Itaipu Binacional. O RBV cobre uma área de 1.920 ha de proteção ambiental da Mata Atlântica. Os habitats são compostos por fragmentos florestais primários e secundários. Os usos dominantes do solo na região de estudo constituem de ocupação humana (<206 km²) e o reservatório da usina hidroelétrica de Itaipu (17,20 km²), conhecido como Lago de Itaipu (Figura 12). As informações de georreferenciamento foram analisadas e editadas usando o software QGIS versão 2.18 (2016).

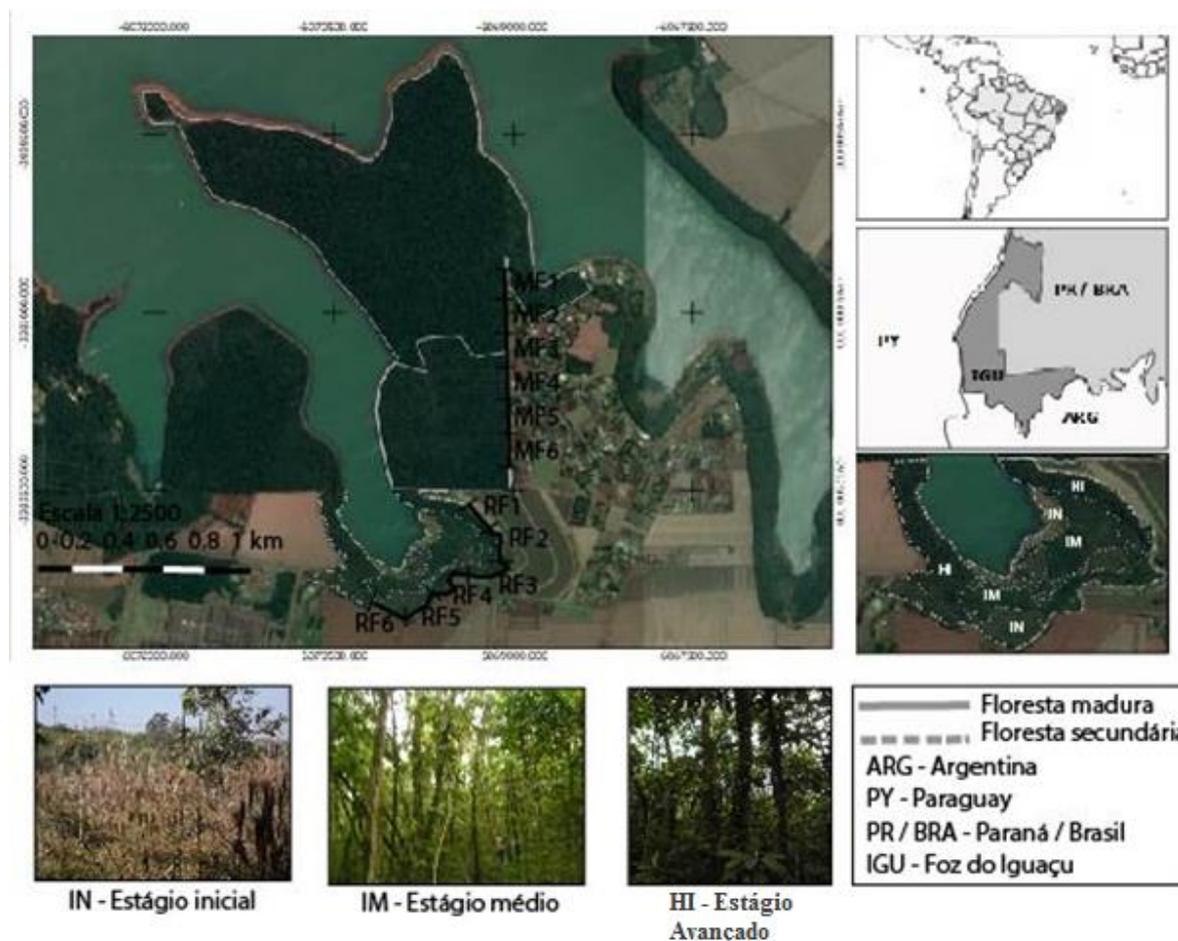


Figura 12. Área de estudo indicando os fragmentos de Mata Atlântica (floresta madura e em regeneração) utilizados para amostragem da comunidade de abelhas silvestres, oeste do Estado do Paraná, Brasil.

Características dos fragmentos florestais

Usamos conjuntos de dados de imagens de satélite (Google Earth-maps) e Global Forest Change para selecionar seis sítios de amostragem com um transecto de 1 500 metros em cada floresta (madura e em regeneração). Essas aplicações foram usadas para fornecer características dos fragmentos florestais e sítios de amostragem (Tabela 3), sendo realizado antes do início das amostragens. Os fragmentos florestais estão separados por cerca de 500 metros. Na região de estudo, a vegetação é classificada como Floresta Estacional Semidecidual pertencente ao bioma Mata Atlântica (IBAMA 1991). Os fragmentos de floresta estudados são formados por vegetação primária e secundária (Brasil 1994).

Tabela 3. Gradiente ambiental: sítios de amostragem, coordenadas geográficas, tamanho (m), altitude (m), estágio da floresta e características dos locais de amostragem em fragmentos de Mata Atlântica (floresta madura e regenerada), oeste do Paraná, Brasil.

Fragmento florestal	Sítios de amostragem	Coordenadas geográficas	Tamanho (m)	Elevação (m)	Estágio florestal	Características dos sítios de amostragem
Floresta madura	MF1	25°26'3100"S 54°30'4054"O	249.73	240	Primária	Remanescente florestal
	MF2	25°26'3285"S 54°31'0868"O	251.99	236	Primária	Remanescente florestal
	MF3	25°26'4150"S 54°31'0844"O	257.96	242	Primária	Remanescente florestal
	MF4	25°26'4976"S 54°31'0784"O	249.58	245	Primária	Reflorestamento
	MF5	25°26'5790"S 54°31'0732"O	255.31	250	Primária	Reflorestamento
	MF6	25°27'0613"S 54°31'0726"O	254.68	251	Primária	Reflorestamento
Floresta em regeneração	RF1	25°27'2632"S 54°31'1381"O	252.70	237	Secundária	Regeneração florestal ^a
	RF2	25°27'3353"S 54°31'1250"O	251.65	237	Secundária	Regeneração florestal ^a
	RF3	25°27'3727"S 54°31'1900"O	249.58	236	Secundária	Regeneração florestal ^a
	RF4	25°27'4070"S 54°31'2743"O	254.83	236	Secundária	Regeneração florestal ^a
	RF5	25°27'4737"S 54°31'3295"O	245.71	233	Secundária	Regeneração florestal ^b
	RF6	25°27'4725"S 54°31'4032"O	249.91	233	Secundária	Regeneração florestal ^b

^a Floresta em processo de regeneração natural com bosque e semi-bosque

^b Floresta em processo inicial de regeneração natural com alta intensidade de *Brachiaria* sp. comparado aos outros sítios de amostragem.

A floresta madura foi estudada em um fragmento com 412 ha e grande diversidade de espécies vegetais, a maioria das árvores é lenhosa e florescem na copa (≥ 40 metros de altura). Além disso, parte do fragmento é composto por vegetação nativa (remanescentes florestais e não perturbados pelo homem) e outra parte é reflorestada com cerca de 40 anos (Itaipu 1978), onde ocorre perda de vegetação devido à ação antrópica. Esse tipo de formação florestal também é conhecido como floresta primária ou “floresta clímax” que são formações florestais que atingiram o estágio mais alto de desenvolvimento da vegetação com alta biodiversidade. Florestas primárias são compostas por comunidades vegetais originais com alta diversidade de espécies, árvores com altura e diâmetros variáveis, atingindo a máxima formação florestal expressa no ambiente e favorecendo a formação de bancos de sementes com mínimo ou nenhum distúrbio humano (Brasil 1994).

A floresta em regeneração foi estudada em um fragmento de floresta secundária com 69 ha com diferentes estágios de regeneração florestal natural. A perda da floresta original (primária) ocorreu devido ao extrativismo, à monocultura e às sucessivas queimadas. A floresta atualmente é composta por três estágios de regeneração ambiental (inicial, intermediário e avançado), com grande incidência de plantas pioneiras de colonização e geralmente exóticas, vegetação jovem com muitos arbustos e pequenas árvores. De acordo com Brasil (1994) a vegetação secundária que essas florestas desenvolvem após a perda total da vegetação original e estão em processo de regeneração natural, compreende estágios sucessionais de formação de plantas (inicial, intermediária e avançada).

Amostragem das abelhas

As abelhas foram coletadas com rede entomológica durante 12 horas, entre as 6:00 e 18:00 horas. Foram realizadas 12 coletas que ocorreram em intervalos de 25 a 30 dias, de outubro de 2013 à setembro de 2014, totalizando 144 horas de amostragem. Selecionamos dois transectos de mil e quinhentos metros (1500 m) na borda de cada fragmento florestal estudado (floresta madura e regenerada). Nesses transectos, cada planta em floração foi observada por 15 minutos e todas as abelhas que visitaram as plantas foram capturadas com uma rede entomológica. Estimamos a riqueza e a abundância de espécies de plantas coletando as plantas com flores que foram visitadas pelas abelhas nas duas florestas. Limitamos a altura das plantas até 3.5 metros para padronizar a amostragem. No laboratório, as plantas foram individualizadas em exsecatas e identificadas por especialista (Z. V. Pereira, da Universidade Federal da Grande Dourados). As espécies de plantas coletadas foram classificadas como: nativas, naturalizadas ou exóticas, segundo o Programa REFLORA / CNPq - Herbário Virtual (REFLORA 2002) e depositadas no Herbário do Museu da Biodiversidade (MuBio) FCBA/UFGD.

No desenho amostral ([Figura 13](#)), selecionamos dois transectos florestais com uma distância percorrida de mil e quinhentos metros (1500 metros). Em cada transecto, selecionamos seis sítios que diferiam no comprimento da borda da floresta (cerca de 250 m) e gradiente ambiental (ver [Tabela 3](#)). As amostragens foram realizadas nos dois fragmentos florestais no mesmo dia, a fim de minimizar os efeitos de fatores climáticos que poderiam influenciar a abundância e riqueza da comunidade de abelhas. Foram realizadas medidas dos fatores abióticos nas duas florestas: luminosidade (lx) (Luxímetro digital), velocidade do vento (m/s) (Anemômetro digital), temperatura (C°) (Termo-higrômetro digital), umidade

relativa do ar (UR) (Termo-higrômetro digital) e precipitação (mm) (Pluviômetro). Em cada transecto, foi percorridos ciclos de 3 000 metros (ida e volta) nas bordas das florestas, cada ciclo (3 000 metros) foi visitado de 4 a 5 vezes por dia durante 12 horas de amostragem, totalizando 13 500 metros por dia em cada transecto (3000 m x 4.5 visitas = 13500 m).

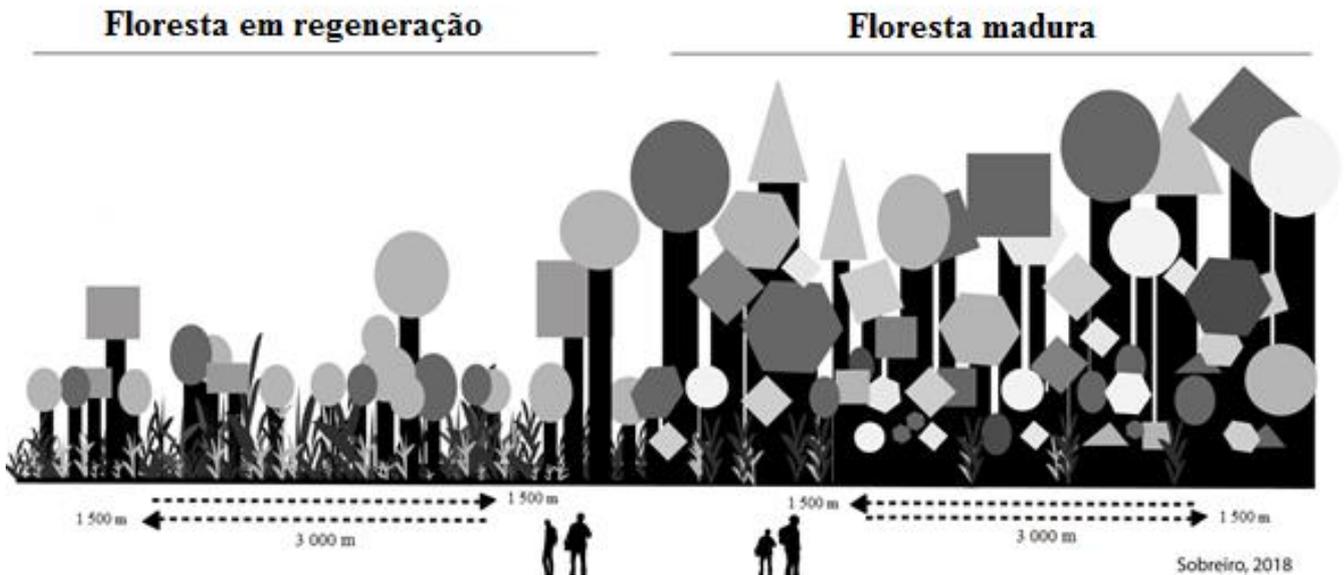


Figura 13. Transecto de mil e quinhentos metros (1500 m) no limite de cada fragmento estudado (floresta madura e regenerada). Cada percurso de 3000 metros foi visitado durante 12 horas de amostragem, totalizando 13500 metros percorridos (3000 m x 4.5 visitados = 13500 m por dia).

As abelhas foram capturadas nos transectos de cada floresta, depois foram sacrificadas com acetato de etila e separadas em sacos de papel para posterior identificação. As sacolas de papel foram identificadas com o número de abelhas na ordem de coleta (1, 2, 3 ...), número da planta visitada, floresta de amostragem, nome da repetição (MF, RF, ver [Tabela 3](#)) e data de coleta. No laboratório, as abelhas foram mantidas em câmara úmida por dois dias, fixadas e identificadas com ajuda de especialista (R. B. Gonçalves, Universidade Federal do Paraná), e por fim, depositadas no Museu do Laboratório de Apicultura FCBA/UFGD.

Análise estatística

O Índice de Shannon-Wiener: $H' = - \sum (p_i) (\ln p_i)$ foi usado para comparar a diversidade amostrada nos sítios. Para entender a dominância de espécies em cada sítio foram

usados o Índice de Berger-Parker (d): $d = N_{\max}/N$ e Simpson (D): $N_2 = 1/\sum p_i^2$. Por fim, o Índice de Equitabilidade (J') foi usado para entender a distribuição do número de indivíduos entre as diferentes espécies, usando a formula $J' = H'_{\text{observada}} / H'_{\text{max}}$, com intervalo entre 0.1 e 1, onde 1 representa o máximo de diversidade (Magurran 2004).

Para entender a sazonalidade na distribuição das abelhas entre os tipos de florestas, usamos gráficos circulares. Estatísticas circulares são comumente aplicadas para analisar o comportamento periódico dos dados dispostos em torno de um círculo (Zheng Sun 2006). Cada medida circular pode ser vista como um ponto em um círculo com raio 1, as unidades são radianos para o Desvio do Padrão Circular e Desvio Angular, mas podem ser convertidos em graus: $\text{graus} = 180 / \pi$ (Jenness 2004). A natureza dos gráficos circulares permite calcular medidas de tendência central e dispersão (Zheng Sun 2006). Para realizar a dispersão da abundância e riqueza de abelhas nos meses utilizamos o pacote *vegan* (Oksanen et al. 2018) e *ggplot2* (Wickham e Chang 2016) usando o software R versão 3.4.1 (R Development Core Team 2017).

Utilizamos ANOVA para testar relações: (i) abundância e riqueza de abelhas por mês de amostragem entre os sítios; (ii) abundância e riqueza de espécies vegetais em ambos os fragmentos florestais; e (iii) influência de *A. mellifera* na comunidade de abelhas silvestres por espécies de plantas visitada. Para testar se a abundância de *A. mellifera* influencia a abundância de abelhas silvestres foi realizada uma Análise de Variância de Duas Vias (ANOVA2way). Para avaliar se as visitas florais de *A. mellifera* afetam as visitas florais de abelhas nativas em ambos os fragmentos florestais, realizamos Análise de Covariância (ANCOVA). ANOVA2way e ANCOVA foram feitas usando o software PAST versão 3.0 (Hammer et al. 2001) e ANOVA usando o software R.

Com o objetivo de comparar a fauna de abelhas amostradas em todos os sítios (12), foi realizada uma análise de componentes principais (PCA). Essa análise é um método estatístico de análise multivariada para identificar a correlação entre a variável e os parâmetros independentes (Abdi & Williams 2010). Para executar a PCA, o eixo 1 representou o composição das espécies e o eixo 2 os sítios de amostragem (12), nesta análise foi usado o pacote *vegan* (Oksanen et al. 2018) implementado no software R.

A análise de correspondência canônica (CCA) foi utilizada para investigar os efeitos das variáveis ambientais e temporais sobre a composição das espécies. Nesta análise, o primeiro eixo representa a assembleia de abelhas nos tipos de florestas e o segundo eixo representa as seis variáveis ambientais e abiótica e biótica (umidade, planta, precipitação, luminosidade, temperatura e vento) e duas variáveis temporais (hora e meses). Utilizamos o

índice de similaridade de Jaccard para associar as relações existentes entre a composição de espécies com as variáveis ambientais e temporais. Estas análises foram realizadas com o pacote vegan (Oksanen et al. 2018) no software R.

Resultados

Abundância e diversidade de abelhas nos tipos de florestas

Coletamos 203 indivíduos, sendo 141 (35 espécies) na floresta madura e 63 (23 espécies) na floresta em regeneração. Todos os indivíduos coletados representaram 5 famílias, 26 gêneros e 40 espécies. Aproximadamente 40% dos indivíduos coletados não foram identificados ao nível de espécie devido à falta de informação taxonômica para certos grupos de abelhas (correspondentes aos gêneros *Arhysosage*, *Augochlora*, *Augochlorora*, *Ceratina*, *Coelioxys*, *Exomalopsis*, *Gaesischia*, *Megachile*, *Ptiloglossa* e a tribo Emphorini). Todos os indivíduos coletados são abelhas nativas, com exceção de *Apis mellifera* 27.09% (55 indivíduos). *Ceratina* sp1 e *Bombus morio* foram às espécies mais abundantes, com 6.40% (13 indivíduos) e 5.91% (12 indivíduos), respectivamente. Os gêneros mais abundantes foram *Exomalopsis* 8.86% (18 indivíduos, 4 spp.), e *Augochlora* 7.38% (15 indivíduos, 3 spp.). A menor abundância de abelhas foi amostrada para 13 espécies com 1 exemplar cada, representando 32.50% de toda a riqueza. Em ambos os fragmentos florestais foram amostradas 17 espécies de abelhas, sendo 18 espécies que ocorreram na floresta madura e 5 espécies na floresta em regeneração (Apêndice 1).

Índice de Shannon-Wiener (H') indicou que a maior diversidade foi na floresta madura ($H' = 2.90$) do que na floresta em regeneração ($H' = 2.64$). A diversidade foi maior no sítio MF2 ($H' = 2.295$) e menor no RF4 ($H' = 0.693$). Enquanto que o Índice de Berger-Parker (d) indicou que a dominância foi maior na floresta em regeneração ($d = 0.28$) do que na floresta madura ($d = 0.26$), provavelmente influenciada pela alta abundância de *A. mellifera* (29.03%) em relação às outras espécies. Entre os sítios, no RF4 e RF5 a dominância foi maior ($d = 0.5$) e o sítio MF2 ($d = 1.66$) foi menor. Para o Índice de Simpson, a menor dominância foi em MF2 ($D = 0.8911$) e maior em RF4 ($D = 0.5$). Deve-se notar que a uniformidade foi maior na floresta em regeneração ($J = 0.84$) do que na floresta madura ($J = 0.81$). Entre os sítios, o RF4 ($J' = 1$) foi maior, e menor no RF5 ($J' = 0.798$).

A abundância de abelhas foi maior na floresta madura por 10 meses, com exceção de Dezembro de 2013 e Junho de 2014, quando foi maior na floresta em regeneração com 11.11% (7 indivíduos, 5 spp.) e 1.58% (1 indivíduo, 1 spp.), respectivamente. Na floresta

madura, os meses com maior abundância e riqueza de abelhas foram Janeiro com 20.56% (29 indivíduos, 15 spp.), Julho com 17.02% (24 indivíduos, 11 spp.) e Fevereiro com 12.05% (17 indivíduos, 12 spp.). Enquanto que na floresta em regeneração, os meses com maior abundância de abelhas foi Janeiro/2014 com 38.68% (25 indivíduos, 11 spp.), Fevereiro/2014 com 23.80% (15 indivíduos, 9 spp.) e Dezembro/2013 com 11.29% (7 indivíduos, 5 spp.). O mês com menor abundância e riqueza na floresta madura foi Junho e na floresta em regeneração foi Maio e Julho, com nenhum indivíduo cada. *Apis mellifera* foi a única espécie que ocorreu durante 11 meses nas duas florestas, seguida de *Augochlora* sp1 com frequência de 6 meses na floresta madura e de *Exomalopsis auropilosa* com frequência de 3 meses na floresta em regeneração. Em adição, a ANOVA indicou diferença significativa da abundância nos sítios por meses (df = 11, F = 2.6722, p = 0.0039) (Figura 14).

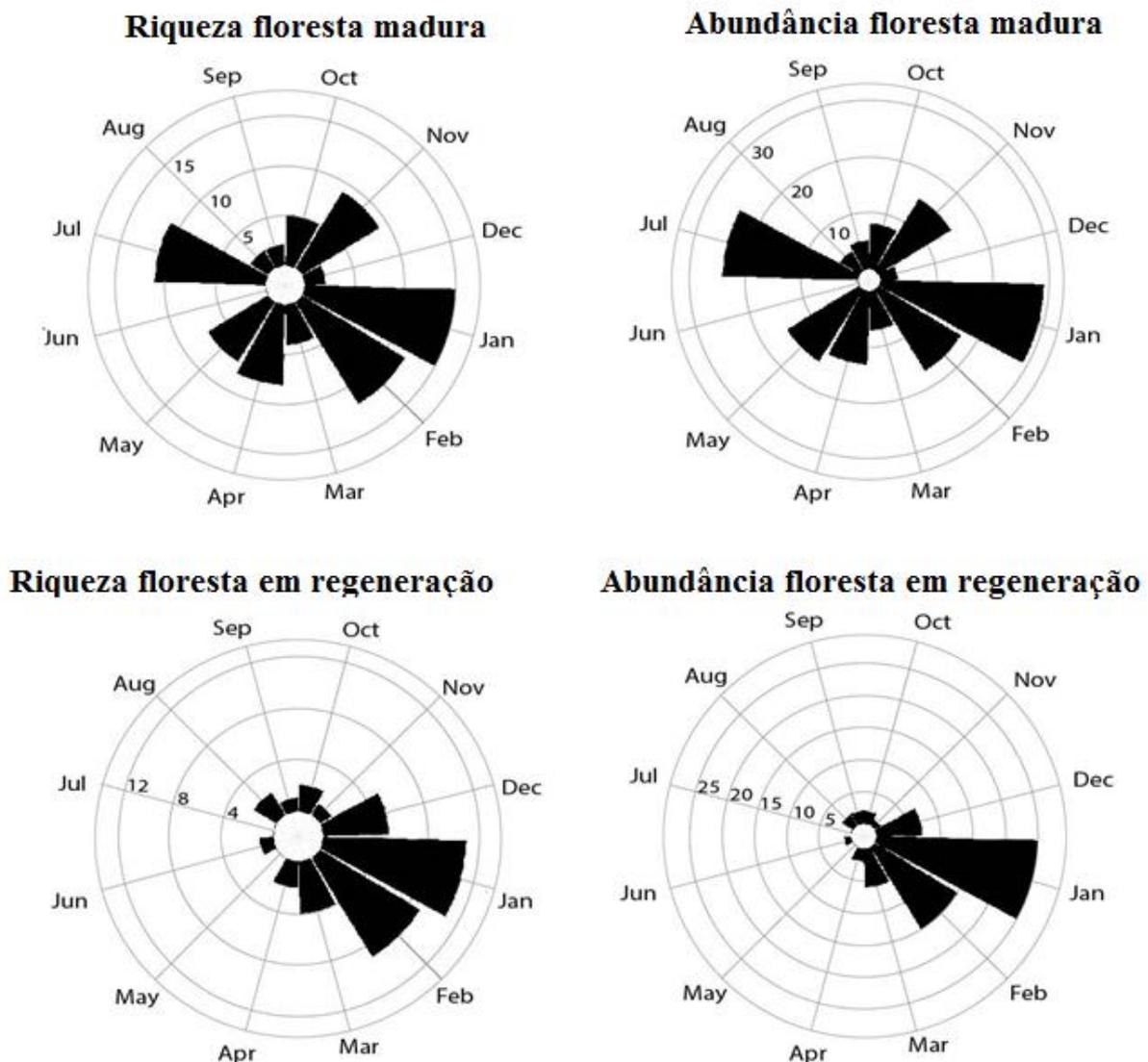


Figura 14. Abundância total e riqueza de abelhas amostradas mensalmente em fragmentos de Mata Atlântica (floresta madura e regenerada), oeste do Estado do Paraná, Brasil. Entre outubro de 2013 a setembro de 2014.

Associação de abelhas e plantas entre tipos de florestas

Coletamos 133 indivíduos de plantas representando 21 espécies. Todos os indivíduos coletados representaram 11 famílias e 20 gêneros (Tabela 4). Destes, 90 indivíduos de plantas (14 espécies) foram coletados na floresta madura e 43 indivíduos (17 espécies) na floresta em regeneração. Apenas um indivíduo coletado pertencente ao gênero *Ludwigia* não foi identificado até o nível de espécie devido à falta de informações taxonômicas para o grupo. As espécies de plantas (Tabela 4) coletadas foram classificadas de acordo com o programa REFLOA / CNPq - Herbário Virtual [REFLOA 2002], sendo 15 plantas nativas, 4 consideradas plantas naturalizadas e 2 plantas exóticas introduzidas no Brasil. *Centratherum punctatum* com 36.84% (49 indivíduos), seguido por *Leonurus sibiricus* com 9.77% (13 indivíduos) e *Hedychium coronarium* com 7.51% (10 indivíduos) foram as espécies mais abundantes, sendo estas três espécies de plantas responsáveis por amostrar a maior abundância de abelhas, representando 58.12% (118 indivíduos, 30 espécies) de todas as abelhas coletadas. *Bidens pilosa*, *Cymbopogon citratus*, *Vernonia scorpioides* e *Ziziphus joazeiro* foram as espécies menos abundantes, com 0.75% (1 indivíduo) para cada espécie. A maior diversidade de plantas 57.14% (12 spp., 23 indivíduos) amostrou a menor abundância de abelhas 15.27% (31 indivíduos). A abundância de plantas foi significativa por mês ($df = 11$, $F = 2,9474$, $p = 0,01303$) e tipos de florestas ($df = 1$, $F = 10.6063$, $p = 0.007643$), enquanto que a riqueza de plantas foi significativa por mês ($df = 11$, $F = 8.4381$, $p = 0.0006872$), mas não por tipo de floresta ($df = 1$, $F = 0.9197$, $p = 0.3584505$).

Tabela 4. Espécies vegetais nativas, naturalizadas e exóticas amostradas em fragmentos de Mata Atlântica (floresta madura e regenerada), oeste do Paraná, Brasil, de outubro de 2013 a setembro de 2014.

Espécies de plantas						
Lista ^a	Família	Espécie	In	Floresta	Classificação ^b	Abelhas ^c
1	Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i> L.	1	M	Naturalizado	1
2		<i>Centratherum punctatum</i> Cass.	49	M, R	Nativa	75
3		<i>Elephantopus mollis</i> Kunth	3	M	Nativa	4
4		<i>Emilia sonchifolia</i> (L.) DC. ex Wight	6	M, R	Nativa	7
5		<i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq.) Cass.	2	R	Nativa	4
6		<i>Tridax procumbens</i> L.	1	R	Nativa	1

7		<i>Vernonia polyanthes</i> (Spreng.) Less.	10	M, R	Nativa	15
8		<i>Vernonia scorpioides</i> (Lam.) Pers.	1	R	Nativa	1
9	Boraginaceae	<i>Heliotropium nicotianaefolium</i> A. DC.	2	M	Nativa	3
10	Commelinaceae	<i>Commelina nudiflora</i> L.	9	M, R	Nativa	11
11	Euphorbiaceae	<i>Croton glandulosus</i> L.	4	M, R	Nativa	4
12	Lamiaceae	<i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) R. Br.	4	M	Naturalizada	8
13		<i>Leonurus sibiricus</i> L.	16	M, R	Exótica	16
14		<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez	2	M, R	Nativa	2
15	Onagraceae	<i>Ludwigia</i> sp1 L.	2	M, R	Nativa	4
16	Poaceae	<i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst. ex A. Rich.) Stapf	3	R	Exótica	4
17		<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	1	R	Naturalizada	2
18	Rhamnaceae	<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	1	R	Nativa	1
19	Solanaceae	<i>Solanum sisymbriifolium</i> Lam.	5	M, R	Nativa	7
20	Verbenaceae	<i>Lantana trifolia</i> L.	4	R	Nativa	6
21	Zingiberaceae	<i>Hedychium coronarium</i> J.Koenig	10	M, R	Naturalizada	27
Total de indivíduos				M:90,R:43	133	203
Total de espécies				M:14,R:17	21	40

^a = Lista de espécies de plantas de acordo com a amostragem de abelhas do apêndice 1; M = floresta madura; R = floresta em regeneração; ---- = não tem resultados; ^b = classificação de acordo com REFLORA/CNPq Programa – Herbário Virtual (REFLORA 2002). ^c = número de abelhas.

Determinantes ambientais e temporais para a diversidade de abelhas

A Análise de Componente Principal (PCA) revelou que não existe diferença na ordenação da assembleia de abelhas entre os sítios de amostragem das florestas ($df = 11$, $F = 1.1233$, $p = 0.172$) (Figura 15). Observamos que os sítios da floresta madura (MF2, MF4, MF5, MF6) e da floresta em regeneração (RP1, RP2, RP3, RP4 e RP5) estão agrupados no eixo central da ordenação pela similaridade na amostragem da maior diversidade de espécies de abelhas com baixa abundância. Os sítios MF3 e MF1 foram os mais distantes dos outros sítios estudados, estes compõem a mesma riqueza de espécies e abundância. É perceptível na ordenação que *A. mellifera*, *Bombus morio* e *Ceratina* sp1 são as espécies mais distantes do eixo central e com maior abundância neste estudo. Novamente, *Ceratina* sp1 é a espécie mais próxima de MF1 e posicionada mais distante dos outros sítios, enquanto *A. mellifera* é a espécie mais próxima de MF3. O agrupamento indicou que os sítios (12) de amostragem não apresentam diferença significativa para a riqueza ($df = 11$, $F = 1.3627$, $p = 0.2095$) e abundância ($df = 11$, $F = 1.3662$, $p = 0.2078$) de abelhas entre os tipos de florestas (Figura 15).

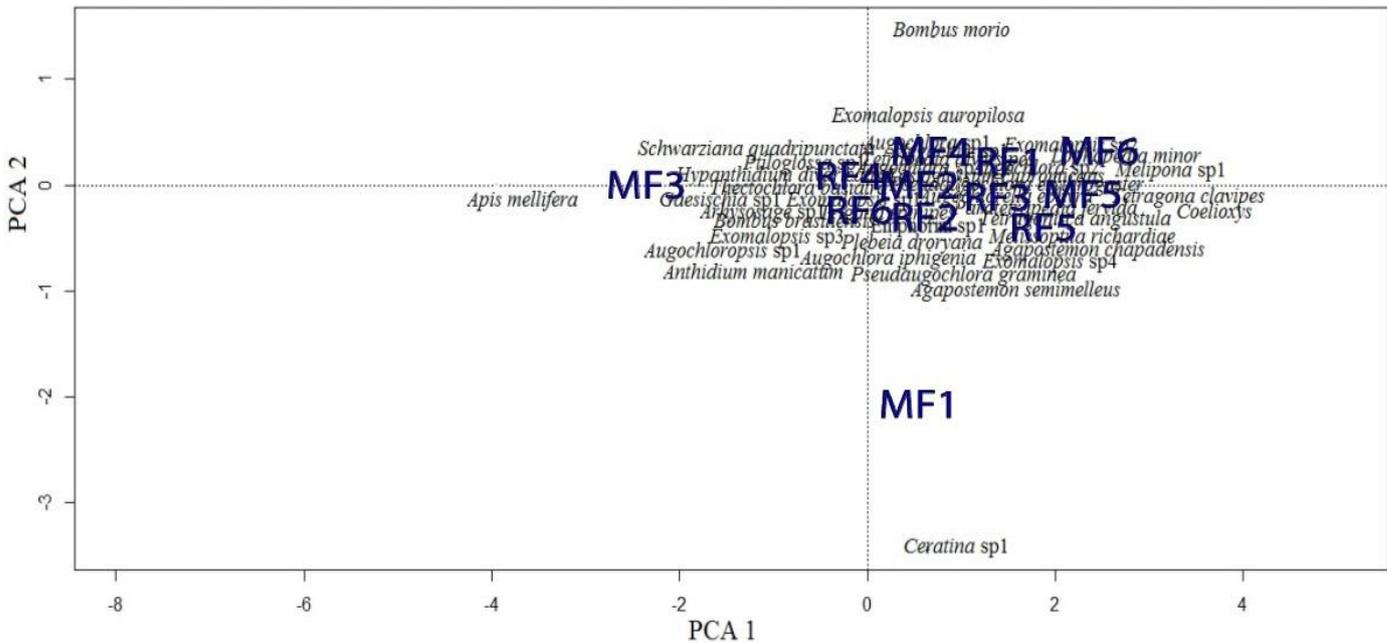


Figura 15. Análise dos componentes principais (PCA) das comunidades de abelhas em 12 sítios de estudo. RF regeneração florestal e MF floresta madura de Mata Atlântica do oeste do Estado do Paraná, Brasil. O eixo 1 representa a comunidade de abelhas e o eixo 2 representa os locais de amostragem.

A Análise de Correspondência Canônica (CCA) indicou que a assembleia de abelhas nos tipos de florestas são influenciadas significativamente pelos fatores ambientais como a temperatura ($df = 20, F = 1.666, p = 0.001$), umidade ($df = 20, F = 1.6084, p = 0.001$), velocidade do vento ($df = 18, F = 1.6556, p = 0.001$), precipitação ($df = 11, F = 1.7867, p = 0.001$) e luminosidade ($df = 19, F = 1.4946, p = 0.001$), pela variação temporal dos meses ($df = 11, F = 1.4376, p = 0.001$) e das horas ($df = 136, F = 1.1417, p = 0.007$), e também pela riqueza de plantas ($df = 20, F = 1.31, p = 0.003$). As mais baixas temperaturas foram registradas ao nascer do sol (entre 06:00 e 07:00 horas) na floresta madura (média 20.12°C) e na floresta secundária (média 21.55°C). A umidade relativa também foi maior ao nascer do sol (entre 06:00 e 07:00 horas) na floresta madura (média 72.89 UR) e na floresta secundária (média 78.54 UR), enquanto que a velocidade do vento e a precipitação variou durante todo o dia nos tipos de florestas (Figura 16).

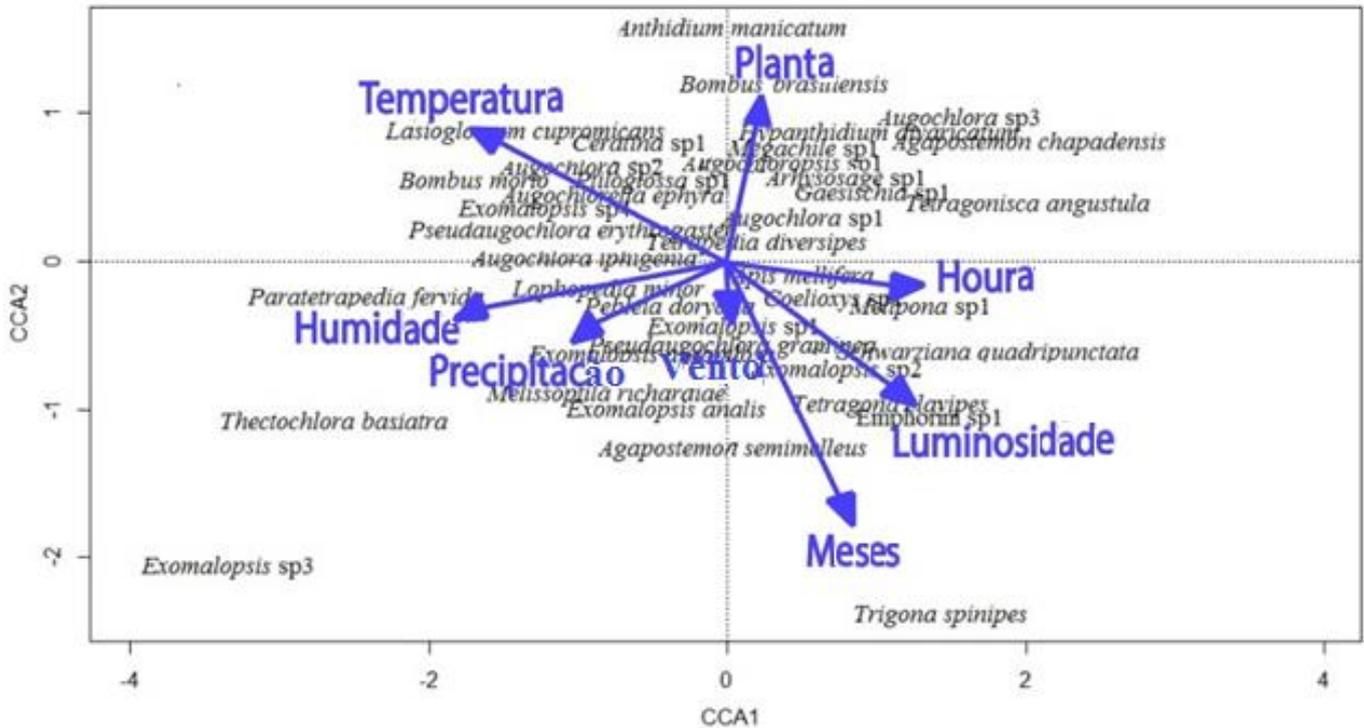


Figura 16. Diagrama de ordenação da Análise de Correspondência Canônica (CCA) com espécies de abelhas, seis variáveis ambientais (umidade, planta, precipitação, luminosidade, temperatura e vento) e duas variáveis temporais (hora e meses). O eixo 1 representa a comunidade de abelhas e o eixo 2 representa os fatores ambientais e temporais.

Influência de Apis mellifera na comunidade de abelhas nativas nos tipos de florestas

A abundância total de *A. mellifera* foi de 55 indivíduos, sendo coletados 37 indivíduos na floresta madura e 18 indivíduos na floresta em regeneração. A abundância dessa espécie variou significativamente por meses ($df = 11$, $F = 1,8878$, $p = 0,04305$), porém não foi significativa para os tipos de florestas ($df = 1$, $F = 0,1683$, $p = 0,6821$), riqueza de plantas ($df = 20$, $F = 1,3819$, $p = 1,1359$) e sítios ($df = 11$, $F = 0,9056$, $p = 0,5361$). A maior abundância de *A. mellifera* na floresta madura foi Julho/2014 com 24,32% (9 indivíduos) e na floresta em regeneração foi Janeiro/2014 com 44,44% (8 indivíduos). Na floresta madura, nenhum indivíduo foi coletado nos meses de Fevereiro e Junho/2014 e por 6 meses (Novembro, Dezembro, Maio, Junho, Julho e Setembro) na floresta em regeneração. A Análise de Covariância (ANCOVA) não foi significativa entre a abundância total de abelhas silvestres e de *A. mellifera* entre os tipos de florestas ($df = 34$, $F = 0,3617$, $p = 0,6993$). Também não encontramos diferenças significativas na abundância de plantas visitadas por *A. mellifera* entre florestas ($df = 34$, $F = 0,8137$, $p = 0,4522$) (Tabela 5).

Discussão

Comparação entre abundância e diversidade de abelhas nos fragmentos florestais

A riqueza e abundância de abelhas entre as bordas das florestas são semelhantes. Encontrado que a recuperação de florestas próximas à floresta madura favorece a uniformidade e equilíbrio da comunidade de abelhas silvestres. Correlacionamos a assembleia de abelhas com os efeitos bióticos e abióticos, e encontramos que a variação temporal e a abundância de plantas influenciam as comunidades de abelhas, mas os tipos de florestas contínuas não afetam a assembleia de visitantes florais. Confrontamos à ocorrência de abelhas silvestres e *A. mellifera* e não encontramos características de competição entre os grupos de abelhas. A antropização da floresta em regeneração parece afetar a preferência de *A. mellifera* por sítios mais conservados como o da floresta madura.

A abundância e composição de abelhas silvestres nos fragmentos de floresta madura e em regeneração não apresentam diferenças significativas, como também observaram (Neame et al. 2013; Roberts et al. 2017). Os índices de diversidade e dominância da floresta em regeneração são semelhantes aos encontrados na floresta madura, com isto, sugerindo que a restauração natural de florestas parece promover a estabilidade da comunidade de abelhas silvestres e também o fragmento em regeneração pode representar um habitat valioso para esse grupo de polinizadores. Apesar da recente informação sobre os efeitos positivos de paisagens heterogêneas nas comunidades de abelhas (Oliver et al. 2010; Ferronato et al. 2017) parece haver estabilidade maior das comunidades desses polinizadores e menor impacto das alterações climáticas em paisagens heterogêneas próximas a florestas maduras ou remanescentes florestais (Boscolo et al. 2017; Ferronato et al. 2017; Papanikolaou et al. 2017).

A variação temporal (meses) da composição e abundância das espécies de abelhas é evidente entre as estações anuais no Brasil (Gostinski et al. 2016; Matos et al. 2016; Aleixo et al. 2017) com estações bem definidas (Junior et al. 2010; Sloboda et al. 2017), e predominância das espécies nas estações de verão e primavera (Junior et al. 2010; Fischer et al. 2016; Roberts et al. 2017), com fatores climáticos favoráveis ao forrageio como intensidade luminosa, temperatura, horas de luz diária e floração abundante (Oliver et al. 2010; Garbuzov et al. 2014; Ramirez et al. 2016; Papanikolaou et al. 2017). Entretanto, nossos resultados indicaram que Julho/2014 (mês de inverno) foi amostrado a 3º maior abundância e diversidade de abelhas silvestres e ocorreu exclusivamente na floresta madura, o

que pode estar indicando a preferência das abelhas por ambientes preservados quando as condições climáticas são desfavoráveis às visitas florais (Kjøhl et al 2011; Silva-Neto et al. 2017), pois a densidade da floresta (maior quantidade de árvores) pode afetar a intensidade do vento (Nemésio and Silveira 2006; Jaroszewicz et al. 2017) favorecendo as atividades do voo em florestas maduras. E também, baixas temperaturas podem provocar eventos climáticos com danos à vegetação (Hatfield et al. 2014; Aleixo et al. 2017; Jaroszewicz et al. 2017; Rihan et al. 2017) causando a perda da diversidade de plantas em sítios não florestados ou em recuperação (Augspurger 2009). Como a atividade do voo está também associada ao processo de floração das plantas (Ramírez et al. 2016), a perda da diversidade de plantas na floresta em regeneração poderia justificar em parte, a abundância e diversidade de abelhas na floresta madura durante o inverno.

Associação entre a comunidade de abelhas e plantas nos fragmentos florestais

Florestas preservadas ou remanescentes (maduras) têm demonstrado uma relação positiva com a riqueza de polinizadores (Donaldson-Matasci & Dornhaus 2012; Giangarelli et al. 2015; Threlfall et al. 2015; Stangler et al. 2016; Boscolo et al. 2017; Ferronato et al. 2017). Embora estas florestas também sugiram maior riqueza floral (Tabarrelti et al. 2010), nossos resultados indicam que a riqueza de plantas (até 3.5 metros de altura) foi maior na floresta em regeneração, apesar da diferença não ser significativa entre as florestas. Assim, a expectativa de que a maior riqueza de plantas sustentaria a maior diversidade de abelhas não foi confirmada neste estudo, sendo que a riqueza e abundância de abelhas silvestres podem estar mais relacionada à disponibilidade de locais para nidificação (Nemésio & Silveira 2006; Stangler et al. 2016; Neame et al. 2017; Kaluza et al. 2017). Deve-se considerar também que a maioria das espécies que formam a vegetação nas florestas maduras floresce próximo ao dossel (Ramalho 2004; Schweiger et al. 2010; Oliveira & Oliveira 2016), e isto poderia afetar a atratividade das flores em estratificação vertical (Frankie & Coville 1979; Ulyshen et al. 2010; Stangler et al. 2016), pois muitas abelhas preferem as flores no dossel (Ramalho 2004; Stangler et al. 2016; Nakamura et al. 2017), neste aspecto provavelmente a floresta madura compõe uma diversidade e abundância floral maior no dossel no que no transecto na borda da floresta.

Os resultados mostram que plantas nativas atraíram maior abundância e riqueza de abelhas que espécies de plantas exóticas ou naturalizadas, como também observaram (Morandin & Kremen 2013; Salisbury et al. 2015). Na maioria dos processos de polinização,

as plantas e os polinizadores são consideradas generalistas, plantas visitadas por inúmeros polinizadores e polinizador que visita muitas plantas com flores (Ramalho 2004; Schweiger et al. 2010; Scaven & Rafferty 2013; Shimizu et al. 2014; Salisbury et al. 2015; Dar et al. 2017). Embora algumas espécies apresentem características morfológicas que indicam a coevolução específica entre flor-polinizador (Shimizu et al. 2014; Dar et al. 2017; Pauw et al. 2017), estas pressões seletivas são dependentes de um longo período evolutivo (milhões de anos), o que poderia explicar a preferência das abelhas por plantas nativas, além de justificar a maior diversidade de plantas nativas estar associada a maior diversidade de abelhas com poucos indivíduos, sendo que 57.14% (12 spp.) das plantas atraíram poucas abelhas (máximo 5 indivíduos). A baixa densidade de plantas invasoras (naturalizadas e exóticas) na floresta em regeneração também pode servir como um indicador de estágio avançado de recuperação da vegetação, e a ocorrência de abelhas neste fragmento pode indicar o envolvimento desses polinizadores no processo de restauração (Brosi et al. 2008; Williams 2011; Ferronato et al. 2017).

Nosso estudo mostrou que as plantas generalistas atraíram maior abundância de abelhas, enquanto que a maior riqueza de plantas atraiu a maior riqueza de abelhas, considerando que *Centratherum punctatum*, *Leoriurus sibiricus* e *Heduchium coronarium* amostraram 75% da abundância total de abelhas. Fowler et al. (2016) e Heinrich (1979) relataram que uma espécie de planta com maior quantidade de recursos e maior abundância floral em uma paisagem ou fragmento florestal possivelmente seja mais visitada pelos polinizadores. Nossos resultados parecem apoiar esta hipótese, apesar de não termos avaliado a estrutura da flora, a menor riqueza de planta atraiu a maior abundância e grande parte da riqueza (41,75%) de abelhas, enquanto que a maior diversidade de plantas foi fundamental na atração da maior riqueza de abelhas (58.25%).

Influência da Apis mellifera na comunidade das abelhas em floresta em regeneração e madura

A competição interespecífica entre polinizadores por um recurso limitado pode afetar a sobrevivência de alguma das espécies envolvidas (Moradin & Kremen 2013; Shimizu et al. 2014; Xie et al. 2016; Maclvor et al. 2017). *Apis mellifera* é uma espécie introduzida e pode competir pelos recursos disponíveis com as espécies de abelhas silvestres (Goulson & Sparrow 2008; Moradin & Kremen 2013; Fowler et al. 2016; Xie et al. 2016; Kallioniemi et al. 2017). Entretanto, nossos resultados não indicaram uma relação significativa de competição

entre a abelha exótica (*A. mellifera*) e as abelhas silvestres nas florestas estudadas, em fragmentos florestais com ampla disponibilidade de recursos a competição pode não ser necessária (Donaldson-Matasci & Dornhaus 2012; Kaluza et al. 2017). Outra observação importante a ser considerada é a predominância de *A. mellifera* na floresta madura, além de não ocorrer durante 6 meses na floresta em restauração, isto pode indicar que a espécie prefere fragmentos com ambientes mais preservados (floresta madura) ou que a comunidade de abelhas do mel está sendo fortemente afetada pelo desmatamento (Murlis et al. 1992; Aleixo et al. 2017), ou ainda, que a comunidade esteja bem estabelecida na floresta madura e não precise procurar outros fragmentos florestais em busca de recursos.

Este estudo contribuiu para a compreensão de como a recuperação natural de florestas próximas a florestas maduras pode favorecer a reintegração das comunidades de abelhas silvestres. Nossos resultados corroboram com a hipótese de que a atividade do voo está mais associada a plantas com flores generalistas, do que com a diversidade de plantas (Shimizu et al. 2014; Salisbury et al. 2015; Dar et al. 2017). Encontramos também que em florestas cuja comunidade de abelhas silvestres está em equilíbrio, a presença de *A. mellifera* não parece interferir nas atividades de forrageamento das abelhas silvestres. E a preferência da abelha do mel em áreas de borda de ambientes preservados (floresta madura) é evidente, apesar da causa não ter sido estudada aqui. Portanto, este estudo sugere que estes fatos refletem a importância da recuperação florestal para a comunidade de abelhas silvestres e podem servir como medidas atraentes em ações futuras de recuperação ambiental.

Agradecimentos

Agradecemos ao Refúgio Biológico Bela Vista (ITAIPÚ Binacional) pela área de estudo, bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pelo apoio laboratorial. Agradecemos ao Dr. Rodrigo Barbosa Gonçalves pela identificação das espécies de abelhas, ao Dr. Alan Sciamarelli e Dra Zefa Valdivina Pereira pela identificação das espécies vegetais. Somos gratos ao grupo ITAIPÚ Binacional pelo apoio no trabalho de campo: Veridiana Araujo Alves da Costa Pereira, Rodolfo Rubik, Jorge Borges dos Santos, Edson Zanlorensi e Jarbas Aguinaldo Teixeira.

Referências

- Aleixo, K.P.; Menezes, C.; Fonseca, V.L.I.; Silva, C.I. Seasonal availability of floral resources and ambient temperature shape stingless bee foraging behavior (*Scaptotrigona aff. depilis*). *Apidologie*. 2017, 48, 117-127. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0456-4>
- Augspurger, C.K. Spring 2007 warmth and frost: phenology, damage and refoliation in a temperate deciduous forest. *Funct Ecol*. 2009, 23, 1031–1039. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01587.x>
- Boscolo, D.; Tokumoto, P.M.; Ferreria, P.A.; Ribeiro, J.W.; Santos, J.S. Positive responses of flower visiting bees to landscape heterogeneity depend on functional connectivity levels. *Perspectives in Ecology and Conservation*. 2017, 15, 18-24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2017.03.002>
- Botsch, J.C.; Walter, S.T., Karubian, J.; González, N.; González, E.K.; Brosi, B.J. Impacts of forest fragmentation on orchid bee (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) communities in the Chocó biodiversity hotspot of northwest Ecuador. *J Insect Conserv*. 2017, 21, 633-643. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10841-017-0006-z>
- Brasil. Define formações vegetais primárias e estágios sucessionais de vegetação secundária. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente, CONAMA. Resolução CONAMA nº2, de 18 de março de 1994. In Resoluções, 1994. Available online: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res94/res0294.html> (accessed 29 November 2016). (In Portuguese).
- Brosi, B.J.; Daily, G.C.; Shih, T.M.; Oviedo, F.; Durán, G. The effects of forest fragmentation on bee communities in tropical countryside. *J Appl Ecol*. 2008, 45, 773-783. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01412.x>
- Dar, S.A.; Hassan, Gh. I.; Padder, B.A.; Wani, Ab.R.; Parey, S.H. Pollination and evolution of plant and insect interaction. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2017, 6, 304-311.
- Donaldson-Matasci, M.C.; Dornhaus, A. How habitat affects the benefits of communication in collectively foraging honey bees. *Behav Ecol Sociobiol*. 2012, 66, 583-592. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00265-011-1306-z>
- Fahrig, L.; Baudry, B.; Brotons, L.; Burel, F.G.; Crist, T.O.; Fuller, R.J.; Sirami, C.; Siriwardena, C.M.; Martin, J-L. Functional landscape heterogeneity and animal biodiversity in agricultural landscapes. *Ecol Lett*. 2011, 14, 101–112. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01559.x>

- FAO. Global Forest Resources Assessment 2015. How are the world's forests changing? Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 2016. Available online: <http://www.fao.org/3/a-i4691e.pdf>. (accessed 15 February 2018).
- Ferronato, M.C.F.; Giangarelli, D.C.; Mazzaro, D.; Uemura, N.; Sofia, S.H. Orchid Bee (Apidae: Euglossini) Communities in Atlantic Forest Remnants and Restored Areas in Paraná State, Brazil. *Neotrop Entomol.* 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0530-2>
- Fischer, L.K.; Eichfeld, J.; Kowarik, J.; Buchholz, S.; Disentangling urban habitat and matrix effects on wild bee species. *PeerJ.* 2016, 4, e2729. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.2729>
- Fowler, R.E.; Rotheray, E.L.; Goulson, D. Floral abundance and resource quality influence pollinator choice. *Insect Conserv Diver.* 2016, 9, 481-494. DOI: <https://doi.org/10.1111/icad.12197>
- Frankie, G.W.; Coville, R. An experimental study on the foraging behavior of selected solitary bee species in the Costa Rican dry forest (Hymenoptera: Apoidea). *J. Kansas Entomol. Soc.* 1979, 52, 591–602.
- Garbuzov, M.; Ratnieks, F.L.W. Quantifying variation among garden plants in attractiveness to bees and other flower-visiting insects. *Funct Ecol.* 2014, 28, 364–374. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12178>
- Giangarelli, D.C.; Aguiar, W.M.; Sofia, S.H. Orchid bee (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) assemblages from three different threatened phytophysiognomies of the subtropical Brazilian Atlantic Forest. *Apidologie.* 2015, 46, 71-83. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0303-4>
- Google Earth-maps. Available online: <http://mapas.google.com>. (accessed 22 September 2017).
- Gostinski, L.F.; Carvalho, G.C.A.; Carvalho, M.M.C.; Albuquerque, P.M.C. Species richness and activity pattern of bees (Hymenoptera, Apidae) in the restinga area of Lencóis Maranhenses National Park, Barreirinhas, Maranhão, Brazil. *Rev. Bras. Entom.* 2016, 60, 319-327. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.rbe.2016.08.004>
- Goulson, D.; Sparrow, K.R. Evidence for competition between honey bees and bumble bees; effects on bumble bee worker size. *J Insect Conserv.* 2009, 13, 177-181. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10841-008-9140-y>
- Hagen, M.; Kissling, W.D.; Rasmussen, C.; Aguiar, M.A.M.; Brown, L.E.; Carstensen, D.W.; Alves-Dos-Santos, I.; Dupont, Y.L.; Edwards, F.K.; Genini, J.; Guimarães Jr., P.R.; Jenkins, G.B.; Jordano, P.; Kaiser-Bunbury, C.N.; Ledger, M.E.; Maia, K.P.; Marquitti,

- F.M.D. Mclaughlin, M.; Morellato, L.P.C.; O'Gorman, E.J.; Trøjelsgaard, K.; Tylianakis, J.M.; Vidal, M.M.; Woodward, G.; Olesen, J.M. Biodiversity, Species Interactions and Ecological Networks in a Fragmented World. *Advances in Ecological Research*. 2012, 46, 89-210. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396992-7.00002-2>
- Hammer, O.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. PAST: Paleontological Statistic software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*. 2001, 4, 1-9. Available online: http://palaeoelectronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm. (accessed 05 January 2016).
- Hansen, M.C.; Potapov, P.V.; Moore, R.; Hancher, M.; Turubanova, S.A.; Tyukavina, A.; Thau, D.; Stehman, S.V.; Goetz, S.J.; Loveland, T.R.; Kommareddy, A.; Egorov, A.; Chini, L.; Justice, C.O.; Townshend, J.R.C. High-resolution global maps of 21st-century forest cover change. *Science*. 2013, 342, 850–853. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1244693>
- Hatfield, J.L.; Prueger, J.H. Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather Clim Extrem*. 2015, 10, 4–10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wace.2015.08.001>
- Heinrich, B. “Majoring” and “Minoring” by foraging bumblebees, *Bombus vagans*: an experimental analysis. *Ecology*. 1979. 60, 245–255. DOI: <https://doi.org/10.2307/1937652>
- Itaipú Binacional. Inventário florestal da região de influência da represa Itaipu. Curitiba: Itaipu Binacional, 1978. Available online: <https://www.itaipu.gov.br/meioambiente/reposicao-florestal>. (accessed 20 February 2017) (In Portuguese).
- Jaroszewicz, B.; Kwiecien, K.; Czortek, P.; Olech, W.; Piroznikow, E. Winter supplementary feeding influences forest soil seed banks and vegetation. *Appl Veg Sci*. 2017, 20, 683-691. DOI: <https://doi.org/10.1111/avsc.12319>
- Junior, N.T.F.; Blochtein, B.; Moraes, J.F. Seasonal flight and resource collection patterns of colonies of the stingless bee *Melipona bicolor schencki* Gribodo (Apidae, Meliponini) in an Araucaria forest area in southern Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* 2010, 54, 630-636. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262010000400015>
- Kallioniemi, E.; Åström, J.; Rusch, G.M.; Dahle, S.; Åström, S.; Gjershaug, J.O. Local resources, linear elements and mass-flowering crops determine bumblebee occurrences in moderately intensified farmlands. *Agric Ecosyst Environ*. 2016, 239, 90-100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.12.039>
- Kaluza, B.F.; Wallace, H.; Heard, T.A.; Klein, A.M.; Leonhardt, S.D. Urban gardens promote bee foraging over natural habitats and plantations. *Ecol Evol*. 2016, 6, 1304-1316. DOI: <https://doi.org/10.1002/ece3.1941>

- Kjøhl, M.; Nielsen, A.; Stenseth, N.C. Potential Effects of Climate Change on Crop Pollination. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2011. Rome.
- Koh, I.; Lonsdorf, E.V.; Williams, N.M.; Brittain, C.; Isaacs, R.; Gibbs, J.; Ricketts, T.H. Modeling the status, trends, and impacts of wild bee abundance in the United States. *PNAS*. 2016, 113, 140-145. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1517685113>
- Maclvor, J.S.; Roberto, A.N.; Sodhi, D.S.; Onuferko, T.M.; Cadotte, M.W. Honey bees are the dominant diurnal pollinator of native milkweed in a large urban park. *Ecol Evol*. 2017, 7, 8456–8462. DOI: <https://doi.org/10.1002/ece3.3394>
- Magurran, A.E. Measuring biological diversity. Blackwell Publishing Company. Oxford. 2004.
- Matos, M.C.B.; Silva, S.S.; Teodoro, A.V. Seasonal population abundance of the assembly of solitary wasps and bees (Hymenoptera) according to land-use in Maranhão state, Brazil. *Rev. Bras. Entomol*. 2016, 60, 171-176. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbe.2016.02.001>
- Morandin, L.A.; Kremen, C. Bee Preference for Native versus Exotic Plants in Restored Agricultural Hedgerows. *Restor Ecol*. 2013, 21, 26-32 DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2012.00876.x>
- Moreira, E.F.; Boscolo, D.; Viana, B.F. Spatial Heterogeneity Regulates Plant-Pollinator Networks across Multiple Landscape Scales. *PLoS ONE*. 2015, 10,4. DOI: e0123628. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123628>
- Murlis, J.; Elkinton, J.S.; Cardé, R.T. Odor plumes and how insects use them. *Annu Rev Entomol*. 1992, 37, 505–532. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.002445>
- Neame, L.A.; Griswold, T.; Elle, E. Pollinator nesting guilds respond differently to urban habitat fragmentation in an oak-savannah ecosystem. *Insect Conserv Diver*. 2013, 6, 57-66. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1752-4598.2012.00187.x>
- Nemésio, A.; Silveira, F.A. Deriving ecological relationships from geographical correlations between host and parasitic species: an example with orchid bees. *J Biogeogr*. 2006, 33, 91-97. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01370.x>
- Oksanen, J.; Blanchet, F.G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlinn, D.; Minchin, P.R.; O'Hara, R.B.; Simpson, G.L.; Solymos, P.; Henry M.; Stevens, H.; Szoecs E.; Wagner, H. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.4-6. 2018. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (accessed 9 October 2017).

- Wickham, H.; Chang W. *ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics*. R package version 2.2.1. 2016. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=ggplot2> (accessed 14 January 2018).
- Oliveira, H.C.; Oliveira, S.M. Vertical distribution of epiphytic bryophytes in Atlantic Forest fragments in northeastern Brazil. *Acta Bot. Bras.* 2016, 30, 609-617. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0102-33062016abb0303>
- Oliver, T.; Roy, D.B.; Hill, J.K.; Brereton, T.; Thomas, C.D. Heterogeneous landscapes promote population stability. *Ecol Lett.* 2010, 13, 473–484. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01441.x>
- Otto, C.R.V.; Roth, C.L.; Carlson, B.L.; Smart, M.D. Land-use change reduces habitat suitability for supporting managed honey bee colonies in the Northern Great Plains. *PNAS.* 2016, 113, 10430-10435. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1603481113>
- Papanikolaou, A.D.; Kuhn, I.; Frenzel, M.; Schweiger, O. Landscape heterogeneity enhances stability of wild bee abundance under highly varying temperature, but not under highly varying precipitation. *Landscape Ecol.* 2017, 32, 581-593. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10980-016-0471-x>
- Pauw, A.; Kahnt, B.; Kuhlmann, M.; Michez, D.; Montgomery, G.A.; Murray, E.; Danforth, B.N. Long-legged bees make adaptive leaps: linking adaptation to coevolution in a plant–pollinator network. *Proc Biol Sci.* 2017, 284. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1707>
- QGIS Development Team. (2016). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation. Retrived from: <http://www.osgeo.org/qgis/> (accessed 30 January 2017).
- R Core Team *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017.
- Ramalho, M. Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. *Acta Bot. Bras.* 2004, 18, 37-47. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062004000100005>
- Ramírez, V.M.; Ayala, R.; González, H.D. Temporal variation in native bee diversity in the tropical sub-deciduous forest of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Tropical Conservation Science.* 2016, 9, 718-734.
- REFLORA/CNPq Programa - Herbário Virtual. Available online: reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ (accessed 10 September 2017). (In Portuguese)

- Rihan, H.Z.; Al-Issawi, M.; Fuller, M.P. Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance. *Journal of Plant Interactions*. 2017, 12,1,143-157. DOI: <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1308568>.
- Roberts, H.P.; King, D.I.; Milam, J. Factors affecting bee communities in forest openings and adjacent mature forest. *For Ecol Manage*. 2017, 394, 111–122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.03.027>
- Rubene, D.; Schroeder, M.; Ranius, T. Diversity patterns of wild bees and wasps in managed boreal forests: Effects of spatial structure, local habitat and surrounding landscape. *Biol Conserv*. 2015, 184, 201-208. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.01.029>
- Salisbury, A.; Armitage, J.; Bostock, H.; Perry, J.; Tatchell, M. Thompson, K. Enhancing gardens as habitats for flower-visiting aerial insects (pollinators): should we plant native or exotic species? *J Appl Ecol*. 2015, 52, 1156-1164. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12499>
- Scaven, V.L.; Rafferty, N.E. Physiological effects of climate warming on flowering plants and insect pollinators and potential consequences for their interactions. *Curr Zool*. 2013, 59, 418-426.
- Schweiger, O.; Biesmeijer, J.C.; Bommarco R.; Hickler, T.; Hulme, P.E.; Klotz, S.; Kuhn, I.; Moora, M.; Nielsen, A.; Ohlemüller, R.; Petanidou, T.; Potts, S.G.; Pysek, P.; Stout, J.C.; Sykes, M.T.; Tscheulin, T.; Vila, M.; Walther, G-R.; Westphal, C.; Winter, M.; Zobel, M.; Settele, J. Multiple stressors on biotic interactions: how climate change and alien species interact to affect pollination. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2010, 85, 777–795. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00125.x>
- Shimizu, A.; Dohzono, I.; Nakaji, M.; Roff, D.A.; Miller III, D.G.; Osato, S.; Yajima, T.; Niitsu, S.; Utsugi, N.; Sugawara, T.; Yoshimura, J. Fine-tuned Bee-Flower Coevolutionary State Hidden within Multiple Pollination Interactions. *Sci Rep*. 2014, 4, 3988. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep03988>
- Silva-Neto, C.M.; Bergamini, L.L.; Elias, M.A.S.; Moreira, G.L.; Morais, J.M.; Bergamini, B.A.R.; Franceschinelli, E.V. High species richness of native pollinators in Brazilian tomato crops. *Braz. J. Biol*. 2017, 77, 506-513. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.17515>
- Sloboda, B.; Marque, R.; Bianchin, J.; Blum, H.; Donha, C.; Silveira, F.; Caprestz, R. Litterfall and Nutrient Dynamics in a Mature Atlantic Rainforest in Brazil. *Floresta Ambient*. 2017, 24, e20160339. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.033916>
- Stangler, E.; Hanson, P.E.; Steffan-Dewenter, I. Vertical diversity patterns and biotic interactions of trap-nesting bees along a fragmentation gradient of small secondary

- rainforest remnants. *Apidologie*. 2016, 47, 527-538. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0397-3>
- Tabarelli, M.; Aguiar, A.V.; Girão, L.C.; Peres, C.A.; Lopes, A.V. Effects of Pioneer Tree Species Hyperabundance on Forest Fragments in Northeastern Brazil. *Conserv Biol*. 2010, 24, 1654-1663. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2010.01529.x>
- Threlfall, C.G.; Walker, K.; Williams, N.S.G.; Hahs, A.K.; Mata, L.; Stork, N.; Livesley, S.J. The conservation value of urban green space habitats for Australian native bee communities. *Biol Conserv*. 2015, 187, 240-248. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.05.003>
- Ulyshen, M.D.; Soon, V.; Hanula, J.L. On the vertical distribution of bees in a temperate deciduous forest. *Insect Conserv Diver*. 2010, 3, 222–228. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1752-4598.2010.00092.x>
- Van Schaik, C.P.; Terborgh, J.W.; Wright, S.J. The phenology of tropical forests: adaptive significance and consequences for primary consumers. *Annu Rev Ecol Syst*. 1993, 24, 353–377. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.es.24.110193.002033>
- Venjakob, C.; Klein, A.M.; Ebeling, A.; Tschardtke, T.; Scherber, C. Plant diversity increases spatio-temporal niche complementarity in plant-pollinator interactions. *Ecol Evol*. 2016, 6, 2249–2261. DOI: <https://doi.org/10.1002/ece3.2026>
- Williams, N.M. Restoration of Nontarget Species: Bee Communities and Pollination Function in Riparian Forests. *Restor Ecol*. 2011, 19, 450-459. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2010.00707.x>
- Xie, Z.; Pan, D.; Teichroew, J.; An, J. The Potential Influence of Bumble Bee Visitation on Foraging Behaviors and Assemblages of Honey Bees on Squash Flowers in Highland Agricultural Ecosystems. *PLoS ONE*. 2016, 11, e0144590. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144590>
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol*. 25, 345–353.

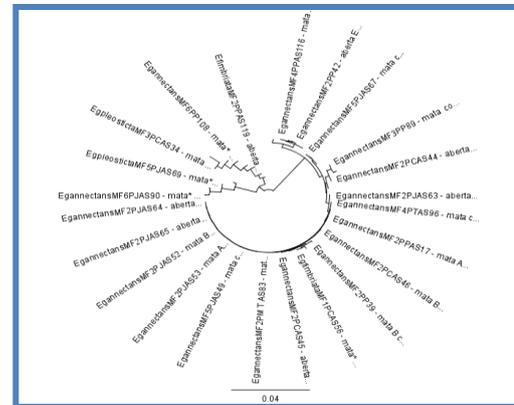
Apêndice 1. Abelhas amostradas em seis locais de fragmentos de Mata Atlântica (floresta madura e em regeneração), oeste do estado do Paraná, Brasil.

Espécies (gênero ou tribo)	Floresta madura						Floresta em regeneração						Lista de plantas (Lista)*
	MF1	MF2	MF3	MF4	MF5	MF6	RF1	RF2	RF3	RF4	RF5	RF6	
Andrenidae													
<i>Arhysosage</i> sp1 Brèthes, 1922	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	(7)
Apidae													
<i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758	3	8	7	9	5	5	3	2	3	1	6	3	(2, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 21)
<i>Bombus brasiliensis</i> Lepeletier, 1836	1	1	0	2	0	2	0	0	0	0	0	2	(2, 13, 19, 20, 21)
<i>Bombus morio</i> (Swederus, 1787)	0	1	0	3	1	2	1	1	0	0	2	1	(2, 7, 10, 11, 13, 16, 19, 21)
<i>Melipona</i> sp1 Illiger, 1806	1	2	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	(2, 21)
<i>Trigona spinipes</i> (Fabricius, 1793)	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	(2)
<i>Plebeia droryana</i> (Friese, 1900)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	(2)
<i>Schwarziana quadripunctata</i> (Lepeletier, 1836)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(21)
<i>Tetragona clavipes</i> (Fabricius, 1804)	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	2	(2,21)
<i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille, 1811)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	(13,21)
<i>Emphorini</i> sp1 Robertson, 1904	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	(21)
<i>Melissoptila richardiae</i> Bertoni & Schrottky, 1910	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	(2,7)
<i>Gaesischia</i> sp1 Michener, LaBerge & Moure, 1955	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	(7)
<i>Exomalopsis analis</i> Spinola, 1853	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	(7, 11, 13, 21)
<i>Exomalopsis auropilosa</i> Spinola, 1853	0	0	0	0	0	0	0	4	2	1	0	4	(2, 7, 19)
<i>Exomalopsis</i> sp1 Spinola, 1853	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	(2)
<i>Exomalopsis</i> sp2 Spinola, 1853	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	(2, 21)
<i>Exomalopsis</i> sp3 Spinola, 1853	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	(2)
<i>Exomalopsis</i> sp4 Spinola, 1853	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	(3)
<i>Lophopedia minor</i> Aguiar, 2009	0	1	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	(2, 3, 9, 10)
<i>Paratetrapedia fervida</i> (Smith, 1879)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	(2)
<i>Tetrapedia diversipes</i> Klug, 1810	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	(2, 15, 20)
<i>Ceratina</i> sp1 Latreille, 1802	0	2	0	3	1	4	0	1	1	1	0	0	(2, 3, 4, 12, 13, 15)
Colletidae													
<i>Ptiloglossa</i> sp1 Smith, 1853	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	(4, 5)
Halictidae													
<i>Augochlora iphigenia</i> Holmberg, 1886	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	(11, 17)
<i>Augochlora</i> sp1 Smith, 1853	2	1	1	1	0	2	0	1	0	1	1	0	(2, 4, 7, 10, 12)
<i>Augochlora</i> sp2 Smith, 1853	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	(2, 10)
<i>Augochlora</i> sp3 Smith, 1853	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	(5, 12, 21)
<i>Augochlorella ephyra</i> (Schrottky, 1910)	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	2	1	(1, 2, 5, 17)
<i>Augochloropsis</i> sp1 Cockerell, 1897	0	0	0	1	0	0	1	1	2	2	1	0	(4, 8, 10, 11, 16, 19)
<i>Lasioglossum cupromicans</i> (Pérez, 1903)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	(2)
<i>Pseudaugochlora erythrogaster</i> Almeida, 2008	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	(18, 19)
<i>Pseudaugochlora graminea</i> (Fabricius, 1804)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(2)
<i>Thectochlora basiatra</i> (Strand, 1910)	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(2)
<i>Agapostemon chapadensis</i> Cockerell, 1900	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	(12, 21)

<i>Agapostemon semimelleus</i> Cockerell, 1900	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(2)
Megachilidae													
<i>Anthidium manicatum</i> (Linnaeus, 1758)	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	(13)
<i>Hypanthidium divaricatum</i> (Smith, 1854)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	(10)
<i>Coelioxys</i> sp1 Latreille, 1809	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(2)
<i>Megachile</i> sp1 Latreille, 1802	2	1	0	3	1	1	0	0	1	0	0	0	(2, 12)
Total of individuals	15	30	17	29	15	35	7	13	14	6	14	8	----
Total of species	9	17	9	14	9	19	5	11	11	5	7	5	----
Índices de diversidade													
Shannon-Wiener (H')	1.277	1.605	1.778	0.693	1.431	1.494	2.133	2.295	1.987	1.975	1.802	1.999	----
Simpson (D-1)	0.693	0.769	0.804	0.5	0.683	0.75	0.875	0.891	0.837	0.834	0.808	0.845	----
Berger-Parker (d)	0.428	0.307	0.307	0.5	0.5	0.375	0.187	0.166	0.235	0.275	0.333	0.2	----
Equitabilidade (J')	0.912	0.859	0.913	1	0.798	0.928	0.970	0.957	0.904	0.898	0.926	0.91	----

* = Lista com número referente a amostras de plantas amostradas (Tabela 2). ---- = não há resultado.

Filogeografia de Euglossini



Capítulo 3

Caracterização morfológica e análise da diversidade haplotípica de *Euglossa annectans* (Hymenoptera, Euglossina)

Resumo

As abelhas Euglossini são consideradas importantes polinizadoras de florestas neotropicais. O gênero *Euglossa* é o mais diversificado desta tribo, compreendendo cerca de 200 espécies válidas. A variabilidade morfológica e genética entre espécimes do mesmo grupo taxonômico não é incomum em espécies amostradas em fragmentos florestais da Mata Atlântica ou do Cerrado. Apesar das elucidações sobre a história evolutiva de Euglossina, algumas relações filogenéticas ainda não são claras, especialmente intraespecíficas. No presente estudo, usamos sequências mitocondriais do citocromo oxidase subunidade I (COI) de espécies de *Euglossa annectans* amostradas em 10 fragmentos florestais com estágios de conservação (floresta madura e secundária) para avaliar a distribuição geográfica de haplótipos e visões taxonômicas, a fim de elucidar a identidade das unidades biológicas envolvidas. Ao todo, 50 amostras das 10 localidades foram utilizadas. O DNA das amostras foi extraído, amplificado e sequenciado para o gene COI. As análises realizadas foram testes de contingência aninhados à variação genética e morfológica, rede de haplótipos, distância genética patristica e análise de parcimônia resultando em uma árvore filogenética. As populações apresentaram um alto nível de diversidade genética em todos os fragmentos amostrados. Os haplótipos encontrados indicam que as diferenças morfológicas são representativas para a diferenciação da *Eg. annectans*. Concluímos que os resultados suportam o reconhecimento de entidades biológicas distintas dentro do grupo *Eg. annectans* com evidência genética e análise de contingência significativa que corroboram para distinção evolucionária.

Palavras-chave: DNA, taxonomia molecular, Euglossini, Cerrado e Mata Atlântica.

Abstract

The subtribe Euglossina includes bees that are considered important pollinators of Neotropical Forests. The genus *Euglossa* is the most diversified of this subtribe, comprising about 200 valid species. The morphological and genetic variability among specimens of the same taxonomic group are not uncommon in species sampled in forest fragments of the Atlantic or Cerrado Forest. Despite elucidations about the evolutionary history of Euglossina, some phylogenetic relationships are still unclear, especially intraspecific. In the present study, the use of mitochondrial sequences of cytochrome oxidase subunit I (IOC) of *Euglossa annectans* species sampled in 10 forest fragments with transition conservation gradients was used to evaluate the geographic distribution of haplotypes and taxonomic visions in order to avoid the identity of the biological units involved. In all, were used 50 samples from 10 localities. The DNA of the samples was extracted, amplified and sequenced for the COI gene. The analyze carried out were contingency tests nested to genetic and morphological variation, haplotype network, Patristic genetic distance, and analysis of parsimony resulting in a phylogenetic tree. The populations showed a high level of genetic diversity in all the fragments sampled. The haplotypes found indicate that the morphological differences are representative for the differentiation of the *Euglossa annectans*. We conclude that the results support the recognition of distinct biological entities within the *Eg. annectans* with genetic evidence and significant contingency analysis that corroborate for evolutionary distinction

Key-words: DNA, molecular taxonomy, Euglossini, Cerrado and Atlantic Forest.

Introdução

Euglossini ou “abelhas das orquídeas” é um grupo de abelhas exclusivo da Região Neotropical, responsáveis pela polinização de uma grande diversidade de plantas com utilização econômica e ecológica (Dressler 1982). A subtribo Euglossina é constituída por pouco mais de 200 espécies descritas (Nemésio 2009; Moure et al. 2012; Nemésio & Rasmussen 2011) distribuídas em cinco gêneros: *Aglae*, *Euglossa*, *Eufriesea*, *Eulaema* e *Exaerete* e pertencente ao clado de abelhas corbiculadas (Michener 1990; Silveira et al. 2002), que é caracterizado pela sinapomorfia das fêmeas possuírem corbícula, uma modificação na tíbia da perna posterior para o transporte de pólen (Silveira et al. 2002). O grupo representa a única linhagem de espécies corbiculadas com organização não social, à maioria das espécies de Euglossina apresentam comportamento solitário e algumas parassociais (Silveira et al. 2002; Ferrari et al. 2017).

As abelhas desta tribo apresentam características morfológicas exclusivas, tais como integumento de coloração metálica, glossa extremamente longa (Silveira et al. 2002; Michener 2007; Nemésio 2009), tíbia posterior dos machos com órgão tibial, coleta de substâncias aromáticas presentes nas flores (Dodson et al. 1969; Michener 2007), e são fundamentais polinizadores da família Orchidaceae, de onde deriva o nome “abelhas das orquídeas” (Silveira et al. 2002; Nunes et al. 2016).

O gênero *Euglossa* Latreile, 1802 é o mais diversificado de Euglossini, representado por aproximadamente 140 espécies (Nemésio & Rasmussen 2011), dividido em seis subgêneros (Dressler 1978). As abelhas pertencentes a este gênero se distinguem dos demais grupos por possuírem labro esbranquiçado com duas manchas ovais transparentes (manchas paraoculares) (Michener 2007), e brilho metálico colorido que varia entre tons de verde intenso, azul, vermelho a roxo (Silveira et al. 2002; Nemésio 2009; Ferrari et al. 2017). As relações filogenéticas são concomitantes com a monofilia dos gêneros de Euglossina, entretanto as relações filogenéticas internas de *Euglossa* são motivos de debates na literatura (Silveira et al. 2002; Ferrari et al. 2014; Ferrari et al. 2017).

O gene COI é mitocondrial, e compreende maior facilidade para ser amplificado em qualquer etapa da vida dos animais e possui algumas características que o fazem adequado como marcador de estudos evolutivos (Lunt et al., 1996) sendo: i) o produto é

amplamente conhecido; ii) possui evolução rápida; iii) regiões altamente conservadas e outras variáveis intimamente associadas ao gene (Saraste 1990); iv) entre as três subunidades que codificam o citocromo *c* oxidase mitocondrial (em *Drosophila yakuba*, o COI é o maior (COI = 511 aminoácidos; COII = 228 aminoácidos e COIII = 261 aminoácidos) (Clary & Wolstenholme 1985); e v) é um dos maiores genes codificadores de proteína do genoma mitocondrial de Metazoa (Lunt *et al.*, 1996)

No caso de paisagens florestais da Mata Atlântica a alteração aos habitats naturais é causada pela ação antrópica das monoculturas, fragmentação das florestas para extrativismo, uso não sustentável dos recursos e pecuária (Moreira *et al.* 2015; Ferronato *et al.* 2017). Atualmente, 80% dos fragmentos restantes do bioma são <50 ha e compõe frações isoladas de florestas (Ribeiro *et al.* 2009). O tamanho do fragmento florestal interfere na diversidade das espécies de Euglossini (Wilcox & Murphy 1985). Relatos sobre o tamanho de populações de Euglossini em fragmentos de Mata Atlântica urbanos ou próximos às cidades demonstram a importância destas frações de florestas para o refúgio das abelhas desta tribo (Ferrari & Stéphanie-Watzel 2009; Stork-Tonon *et al.* 2011).

A Mata Atlântica e o Cerrado são conhecidos como um *hotspot* da biodiversidade e como uma das florestas mais ameaçadas do mundo (BRASIL 2009; Ribeiro *et al.* 2009; Brito *et al.* 2013), além de estarem entre os biomas brasileiros com formações vegetais extremamente heterogêneas (IBAMA 1991; BRASIL 2010). Alguns estudos envolvendo as comunidades de Euglossini indicam padrões de diversidade e sazonalidade das espécies associadas a gradientes de conservação das florestas (como remanescentes, reflorestamentos, florestas secundária) (Brito *et al.* 2013; Moreira *et al.* 2015; Boscolo *et al.* 2017; Ferronato *et al.* 2017), no entanto, os gradientes ambientais em escalas locais que afetam a fauna destas abelhas ainda não estão claros.

Estudos em nível molecular mostraram que populações de abelhas de orquídeas em áreas urbanas não parecem sofrer problemas genéticos (por exemplo, endogamia), o que pode indicar que essas abelhas estão adaptadas a esse ambiente (Cerântola *et al.*, 2010). Em outro estudo, os autores investigaram a população em fragmentos isolados em ilhas e descobriram que o coeficiente de endogamia é maior em ilhas isoladas, mas a população não está sob risco de extinção local através de vórtices masculinos diploides, mesmo quando o mar atua como uma barreira geográfica à dispersão (Boff *et al.*, 2014). Apesar de ambos os estudos terem sido conduzidos em diferentes ambientes eles

mostraram que a escala temporal pode ser um fator importante para o restabelecimento da população. Assim, a questão que ainda permanece é: como seria o efeito da fragmentação que as abelhas foram submetidas mais recentemente? Os eventos mais recentes de fragmentação afetariam diversificação de linhagem das comunidades?

Contudo, estudos com espécies de Euglossini relatam ocorrência da variabilidade morfológica e genética entre exemplares de um mesmo grupo taxonômico, mostrando diferenças na coloração, textura, características morfológicas (Freira et al. 2012; Ferrari et al. 2014; Penha et al. 2015; Ferrari et al. 2017), e alguns casos nos caracteres de identificação, além das inconsistências sistemáticas (Nemésio & Angel 2012; Ferrari & Melo 2014; Ferrari et al. 2017). Em vista o potencial de polinização de Euglossina à flora nativa, pesquisas que possibilitem esclarecer a relação entre os gradientes ambientais e as relações interespecíficas são fundamentais para elucidar os efeitos sobre a história evolutiva do grupo e fornecer subsídios para preservação e conservação de habitats naturais.

Neste estudo, combinamos a matriz de dados morfológicos com sequências mitocondriais de espécies de *Euglossa* amostradas em 10 fragmentos florestais com diferentes gradientes de conservação, na tentativa de investigar as relações interespecíficas e as diferenciações morfológicas das espécies, a fim de eludir a identidade das unidades biológicas envolvidas. Aqui é dada mais atenção à espécie *Euglossa annectans*.

Materiais e métodos

Região de estudo e locais de amostragem

O estudo foi conduzido em dez fragmentos de floresta com diferentes graus de preservação de florestas tropicais e subtropicais no centro-sul do Brasil. Os fragmentos estão localizados nos estados do Mato Grosso do Sul (MS) e Paraná (PR) com ocorrência dos biomas Mata Atlântica (MA) e Cerrado (CE) abrangendo vegetação de transição entre os *hotspots*. Dos fragmentos estudados, cinco são compostos por vegetação de floresta madura e cinco por floresta secundária (Tabela 5 e 6). Na região de estudo o uso dominante do solo são monoculturas (soja e milho) e pastagem para pecuária. Como em algumas paisagens florestais da Região Neotropical, os fragmentos

de florestas são pequenos com forma irregular e geralmente isolados (não ligados por corredores florestais) (Figura 17). O mapa mostrando informações geográficas dos fragmentos foi obtido usando o software QGIS versão 2.18 (2016).

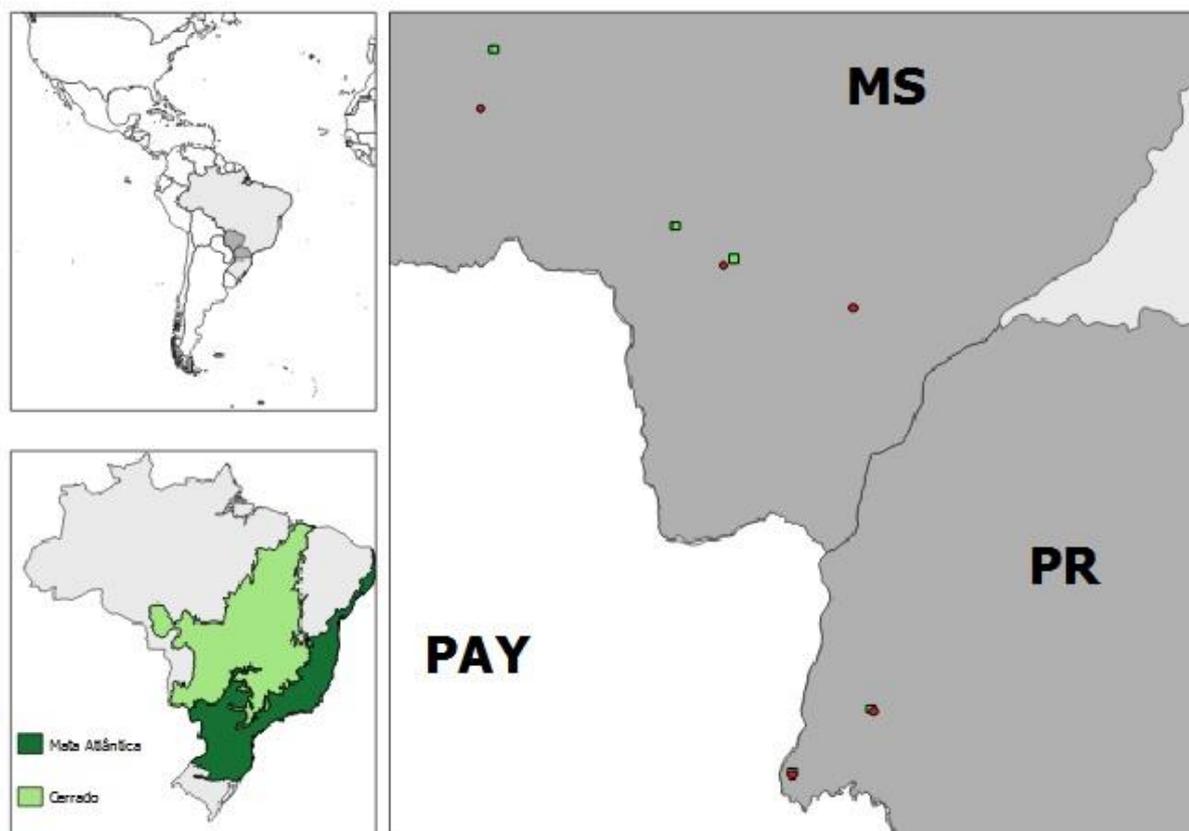


Figura 17. Localização dos 10 fragmentos florestais e os sítios de amostragem usados neste estudo para a comunidade de Euglossina. Mapa inferior à esquerda mostra a área de ocorrência dos biomas Mata Atlântica e Cerrado. Quadrados verdes nas imagens do mapa a direita, mostram os fragmentos de floresta maduros. Círculos vermelhos nas imagens do mapa a direita mostram os fragmentos de floresta secundárias. Sítios MS referem se ao Mato Grosso do Sul. Sítios PR referem se ao Paraná. PAY = Paraguai.

Tabela 5. Gradientes ambientais: localização, coordenada geográfica, elevação (m), tamanho do fragmento (ha), fase florestal, classificação da vegetação, bioma e sítio de amostragem em dez fragmentos floresta madura ou secundária no centro-sul do Brasil.

Localização	Sítio	Coordenada geográfica	Elevação (m)	Tamanho (ha)	Fase florestal	Características da vegetação	Classificação da vegetação ^b	Bioma
Itahum, MS	IFM	-21.996392 -55.321978	431	12.8	Floresta madura	Remanescente.	Savana (sensu stricto)	Cerrado
Glória de Dourados, MS	GDS	-22.519565 -54.106689	375	40.5	Floresta secundária	Reflorestamento e regeneração	Estacional Semidecidual	Mata Atlântica
Foz do Iguaçu, PR	FIM	-25.4425908 -54.5232787	247	412	Floresta madura	Remanescente e reflorestamento	Estacional Semidecidual	Mata Atlântica
Foz do Iguaçu, PR	FIS	-25.4594522 -54.5231929	225	69	Floresta secundária	Regeneração natural	Estacional Semidecidual	Mata Atlântica
Bonito, MS	BFM	-20.8665888 -56.5631859	436	54.871	Floresta madura	Remanescente	Transição ^a	Mata Atlântica /Cerrado
Serra da Bodoquena, MS	SBS	-21.2464384 -56.654671	421	1.612	Floresta secundária	Remanescente e reflorestamento	Transição ^a	Mata Atlântica /Cerrado
Vera Cruz do Oeste, PR	VCM	-25.0480566 -53.9864507	533	3.347	Floresta madura	Remanescente	Estacional Semidecidual	Mata Atlântica
Vera Cruz do Oeste, PR	VCS	-25.0650745 -53.967525	549	19.1	Floresta secundária	Reflorestamento, estágio alto	Estacional Semidecidual	Mata Atlântica
Dourados, MS	DFM	-22.207831 -54.921735	451	75.2	Floresta madura	Remanescente	Estacional Semidecidual	Mata Atlântica
Dourados, MS	DFS	-22.247494 -54.993300	386	10.6	Floresta secundária	Floresta de galeria	Transição ^a	Mata Atlântica /Cerrado

^a Localidade de transição entre Florestas Estacional Semidecidual Submontanhosa e Cerrado. ^b Classificação de acordo com IBGE (1991).

Tabela 6. Distância geográfica entre fragmentos florestais para a população de *Euglossa* analisadas geneticamente no centro-sul, Brasil

Localidade	Distância (km)										Data de amostragem	
	IFM	GDM	FIM	FIS	BFM	SBS	VCM	VCS	DFM	DFS		
IFM	---											2013
GDS	137.35	---										2017
FIM	390	326.29	---									2013/2014
FIS	391.92	328.06	1.89	---								2013/2014
BFM	159.73	298.67	513.13	514.04	---							2009
SBS	176.80	311.33	546.18	548.13	41.10	---						2009
VCM	360.56	278.16	67.59	69.08	498.84	529.23	---					2016
VCS	366.45	282.70	69.96	71.14	503.87	534.05	5.61	---				2017
DFM	47.62	89.72	360.29	562.52	203.64	225.05	324.94	331.01	---			2017
DFS	43.45	95.50	357.12	558.94	207.88	222.25	326.94	329.10	8.70	---		2013/2014

Usando imagens de satélite do Google Earth Pro, fotografias aéreas (USGS) e visitas aos fragmentos classificamos a fase florestal e características ambientais dos fragmentos estudados (Tabela 5). A descrição das características ambientais dos fragmentos foi realizada antes de iniciar as amostragens. Os sítios (10) de amostragem foram demarcados adentrando 500 metros da borda florestal em cada fragmento (floresta madura ou secundária). Para reduzir a autocorrelação espacial a distância mínima de amostragem entre cada sítio foi 500 metros nos tipos de floresta.

Características da fase florestal

Florestas maduras são formadas por grande diversidade de espécies da vegetação em que a maioria dos indivíduos chega à fase reprodutiva, ocorrência de árvores antigas com alturas e diâmetros diferentes formando um dossel fechado que favorece o desenvolvimento de espécies de plantas tardias e a formação de bancos de sementes (Brasil 1994). Este estágio de formação florestal com desenvolvimento máximo da vegetação, também conhecidos como “clímax” ou “primária”, abrange fragmentos de remanescente florestal ou com vegetação recuperada após um período de perturbação antrópica que ocasionou a perda da cobertura natural (Brasil 1994, Brasil 2010). Neste estudo os fragmentos de florestas maduras compreendem remanescentes e florestas recuperadas.

Florestas secundárias são formações florestais que sofreram grande perturbação antrópica e estão em processo de regeneração natural ou sendo recuperadas por meio de ações estratégicas (reflorestamento) (IBAMA 1991; Brasil 1994). Esta formação florestal é composta por vegetação com estágios diferentes de regeneração (inicial, intermediário e avançado), geralmente jovem, com grande incidência de plantas arbustivas e de colonização pioneira, pouca ou nenhuma espécie lenhosa (Brasil 1994). Florestas secundárias geralmente não conseguem atingir a mesma diversidade e desenvolvimento ecológico que florestas maduras (BRASIL 2010). Neste estudo a vegetação original dos fragmentos de floresta secundária foi perdida pelo cultivo de monoculturas (milho, soja e trigo), extrativismo e pecuária.

Estratégia de amostragem

Os machos de abelhas Euglossini foram amostrados por doze meses nas localidades florestais, as amostragens ocorreram entre Janeiro 2009 e Dezembro 2017 (Tabela 6). Em cada localidade estudada foram usadas cinco diferentes fragrâncias (cineol, eugenol, salicilato de metila, vanilina e cinamato). As armadilhas foram fixadas em cada localidade de amostragem a 1.5 metros de altura e permaneciam expostas durante todo o período de amostragem. Mensalmente as armadilhas foram visitadas para coleta do material biológico, limpeza, reposição das fragrâncias e solução conservante.

As armadilhas foram confeccionadas com garrafas de plástico tipo Pet (2 L). Em cada armadilha foi adicionada uma solução conservante contendo: 200 ml de água, 100 ml de álcool a 92.6%, 15 ml de detergente neutro e incolor, 5 g de cloreto de sódio (sal de cozinha). As amostras de abelhas foram coletadas, armazenadas em potes de coletor (80 mL), etiquetadas conforme a localidade e fragrância, e estocadas em freezer. No laboratório, os exemplares de abelhas foram limpos e alfinetados para identificação com auxílio de especialistas (G.A.R. Melo e R.B. Gonçalves). Os exemplares foram depositados na Coleção de abelhas do Laboratório de Apicultura da Universidade Federal de Dourados.

Características morfológicas

Foram analisados parâmetros morfológicos de todos os exemplares dos machos de *Euglossa*. Cada exemplar foi detalhadamente examinado e descrito com auxílio de esteriomicroscópio com iluminação fluorescente e sistema ótico Greenough (3 dimensões) (LEICA EZ4). Antes de iniciar o exame morfológico dos exemplares foram selecionados os caracteres descritos nas chaves taxonômicas de identificação das espécies de *Euglossa* da Região Neotropical (Faria & Melo 2007; Hinojosa-Díaz & Engel 2011; Nemésio & Engel 2012; Ferrari et al. 2017). Durante o exame morfológico cada caráter (ver *Caracteres morfológicos*, pag 88) diferente observado que não constava na matriz de dados foi adicionado e observado em todos os exemplares. Ao final, a matriz de dados morfológicos consta de 58 estruturas descritas e 198 caracteres diferentes (contando que cada estrutura (58) contem entre 1 a 7 caracteres). Destes, 180 são caracteres discretos (não mensuráveis) e 18 são contínuos (mensuráveis). Os caracteres contínuos foram medidos em cada exemplar (50 indivíduos) com uso de régua milimétrica e lupa.

Extração do DNA e sequenciamento

As etapas de extrações do DNA e análises foram realizadas no Institute of Evolutionary Biology do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CISC), Barcelona, Espanha. Para a extração dos dados moleculares foram usados 50 machos coletados (máximos três anos que estavam na coleção entomológica). Os espécimes selecionados continham as seguintes características: i) identificados como *Euglossa annectans* e ii) diferenças na coloração e estruturas morfológicas. Foram removidas duas pernas direitas de cada exemplar com pinças flambadas e armazenadas em tubos de eppendorf individual (1.5 ml) devidamente etiquetados. O protocolo utilizado para extração do DNA mitocondrial foi específico para regiões genômicas e foi cedido pelo Laboratório de Biologia Evolutiva do CISC, onde o material genético foi extraído por maceração das pernas com DNeasy Blood & Tissue Kits de extração (Qiagen Iberia, Madrid, Espanha).

Para cada conjunto de amplificação foram montadas reações controle, contendo todos os reagentes da reação. Foram tomados todos os cuidados para não que ocorresse contaminação do material. Ao final, as amostras de DNA obtidas foram armazenadas no freezer do Laboratório de Apicultura FCBA/ UFGD.

Para reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizamos o seguinte protocolo: 2 µL da amostra de DNA (> 15 mL DNA medido no nanodrop) e 24 µL do mix contendo: 18.4 µL ddHOH (água biodestilada e autoclavada), 2.5 µL de buffer concentração 10X, 1.5 µL MgCl₂ 50 mM, 0.5 µL dNTPs 10 mM, 0.5 µL de cada primer utilizado, do forward e reverse (os que foram utilizados em cada amplificação), e 0.1 µL de taq, totalizando um volume de 26 µL.

Na PCR foi utilizado 0.1 µL de taq polimerase e condições padrão de 40 ciclos 3 minutos de desnaturação a 96°C, seguido por 30 segundos anelamento a 94°C, e 1 minuto de alongamento a 72°C. Uma alíquota de 2.5 µL de cada amostra amplificada foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 0.5%, corado com 0.065 µL de corante Ladder (marcador de nucleotídeos) e visualizados em luz UV (ultravioleta) no equipamento apropriado e fotografados utilizando o sistema de documentação e análise de eletroforese.

O fragmento de gene amplificado foi o citocromo oxidase subunidade 1 (COI) com uso de 8 *primers* (LEPF, LEPR, Cb, Paty, Jerry, Tom, Chy, Paty modificado) (Tabela 7). O conteúdo de DNA amplificado foi quantificado usando nanodrop. Para o sequenciamento foram selecionadas apenas as amostras amplificadas com sucesso conforme o *primers* testado.

O sequenciamento direto do mDNA foi realizado pelo laboratório Genomics Core Facility da Universitat Pompeu Fabra em Barcelona-Espanha, com um analisador DNA sequenciador.

Tabela 7. Sequências (*for* e *reverse*) de *primers* testados para a amplificação de fragmentos de mDNA do gene COI de *Eg. annectans* e as respectivas referências.

<i>Primer</i> *	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>reverse</i>	Referência
Cb3	GAGGAGCAACTGTAATTACTAA	---	Barraclough et al. 1999
Cb4	---	AAAAGAAA(AG)TATCATTCAGGTTGAAT	Barraclough et al. 1999
Chy	TWGTAGCCCAAYTTTCATTAYGT	---	Ribeiro et al. 2010
Jerry	CAACATTTATTTTGATTTTTTTGG	---	Simon et al. 1994
LepF	ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG	---	Hebert et al. 2003
LepR	---	TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA	Hebert et al. 2003
Paty	---	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	Simon et al. 1994
Tom	---	ACRTAATGAAARTGGGCTACWA	Ribeiro et al. 2010

* = Nome do *primer*.

Delineamento de espécies

Todas as sequências foram editadas e alinhadas individualmente usando Geneious Pro 11.1.4 Gateway®. Este software também foi utilizado para tradução das sequências de aminoácidos, junção e comparação das sequências obtidas, verificação da presença de códons de parada e comparação com sequências disponibilizadas no GenBank® (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) através da ferramenta BLAST. Os clados foram separados usando os agrupamentos entre as amostras sequenciadas realizado no programa, com este também obtivemos as distâncias genéticas entre as amostras e a porcentagem de bases nitrogenadas de cada sequência.

Dentre as amostras que foram extraídas o DNA (115), algumas se mostraram de difícil amplificação (65), foram testadas com todos os *primers* LEPF, LEPR, Cb, Paty, Jerry, Tom, Chy, Paty modificado e em diferentes concentrações, porém não foram amplificadas com sucesso.

Análises dos dados

A variabilidade genética de cada amostra foi determinada usando o programa Geneious Pro 11.1.4 Gateway®. Determinamos, neste trabalho, diversidade genética associada ao número de alelos por locus. A distância Patrística também foi obtida entre os haplótipos com o uso do programa Geneious. A estrutura populacional dos haplótipos¹ foi examinada usando o modelo Bayesiano de agrupamento.

O programa TCS versão 1.21 (Clement et al. 2000) foi usado para realizar a estimativa de redes filogenéticas aplicando parcimônia estatística. Este software foi usado para agrupar os cladogramas e diferenciar os haplótipos, assim como, para organizar a rede de passos entre os haplótipos.

A análise de contingência realizada entre a distância geográfica e os caracteres morfológicos foi usada para testar o valor significativo das diferenças morfológicas entre os haplótipos amostrados. Esta análise foi realizada no software R versão 3.4.1 (R Development Core Team, 2017).

Resultados

Relação filogenética

Obtivemos 13 haplótipos de 50 amostras amplificadas com sucesso para o fragmento do gene COI (Tabela 8). Os fragmentos do gene COI que foram amplificados contêm entre 229 e 842 pares de base. A maioria das amostras com mais de um indivíduo apresentam características polimórficas, variação fenotípica, mas com o mesmo haplótipo, podendo apresentar até sete alelos variantes na sequência nucleotídica (Tabela 6 e 8). A maioria das localidades de amostragem compartilham haplótipos, a única exceção é Dourados-MS que mostra um único haplótipo (haplótipo 8), também encontrado em Glória de Dourados-MS, Foz do Iguaçu-PR e Vera Cruz do Oeste-PR.

Dentre os 13 haplótipos de fragmentos do COI obtidos, 96 apresentam substituições sinônimas e 12 não sinônimas (Tabela 8). No geral, das 50 amostras amplificadas, foram encontrados no total 108 alelos variantes, com variação entre 1.85% (2 mutações) em Dourados-MS e 48.14% (52 mutações) em Foz do Iguaçu-PR (Figura 18).

Tabela 8. Rede de haplótipos analisados para a comunidade de Euglossina. Número de haplótipos, localidade, taxa, tamanho do alelo (pb), essência atrativa e número de indivíduos para cada haplótipo obtido.

Nº dos haplótipos	Localidade	Taxa	Tamanho do alelo (pb)	Essência	Nº de indivíduos
1	IFM	<i>Eg. sp 1</i>	737	Eugenol	1
2	IFM	<i>Eg. Heterosticta</i>	762	Eugenol	1
3	GDM	<i>Eg. sp 3</i>	810	Eugenol	1
4	FIM	<i>Eg. sp 4</i>	429	Eugenol	1
5	IFM	<i>Eg. sp 5</i>	725	Eugenol	1
	FIM	<i>Eg. Fimbriata</i>	640	Eugenol	1
	FIS	<i>Eg. sp 6</i>	291	Eugenol	1
	SBS	<i>Eg. sp 7</i>	440	Vanilina	1
	FIM	<i>Eg. sp 8</i>	743	Cineol	1
	VCS	<i>Eg. Securigera</i>	842	Cineol	1
	GDM	<i>Eg. sp 9</i>	810	Cineol	1
	IM	<i>Eg. Liopoda</i>	761	Eugenol	1
6	FIS	<i>Eg. sp 10</i>	440	Eugenol	1
7	FIM	<i>Eg. Annectans</i>	400	Cineol	1
8	FIM	<i>Eg. Annectans</i>	842	Cineol	2
	DFS	<i>Eg. Annectans</i>	373	Eugenol	1
	DFM	<i>Eg. Annectans</i>	414	Vanilina	1
	VCM	<i>Eg. Annectans</i>	842	Cinamato	1
	FIM	<i>Eg. Annectans</i>	373-810	Cineol	6
	FIS	<i>Eg. Annectans</i>	781-842	Cineol	3
	GDM	<i>Eg. Annectans</i>	842	Cineol	2
	FIM	<i>Eg. Annectans</i>	810	Eugenol	1
	FIS	<i>Eg. Annectans</i>	425-842	Eugenol	4
	FIM	<i>Eg. Annectans</i>	781	Sal. M. ^a	1
	FIS	<i>Eg. Annectans</i>	418	Vanilna	1
9	FIM	<i>Eg. Annectans</i>	781	Cineol	1
10	BFM	<i>Eg. Annectans</i>	341-781	Eugenol	3
	FIS	<i>Eg. Annectans</i>	429	Cineol	1
11	FIM	<i>Eg. Annectans</i>	781	Cineol	1
	VCM	<i>Eg. Annectans</i>	332	Cinamato	1
12	GDM	<i>Eg. Annectans</i>	810	Eugenol	1
	GDM	<i>Eg. Annectans</i>	809	Vanilina	1
	GDM	<i>Eg. Annectans</i>	842	Cinamato	1
13	GDM	<i>Eg. Annectans</i>	449	Cineol	1
	FIS	<i>Eg. Annectans</i>	782	Cineol	1
	FIS	<i>Eg. Annectans</i>	782	Vanilina	1

^a Salicilato de metila.

```

1 AATAATGCTTTCAAATGTTTAAAGTTTTATGTGGAACAATGGTCGACAAATTTATTATCTCTCATAATAATTTGTAN---
2 .....G.....A.....TTTT
3 .....N.....N.....N.N.....N.....N.....N.N.....T...
4 .T..A.....N...T.A.....A.....N.N.....T...
5 .T..N.N.....N.N.T.A.T...T.A..N..T...A.N.....T...A...T...
6 .T..G.....C.T.A.T...T.A..A..T...A.G.....T...A...T...
7 .T.T.A.A...T.G.A..G.....T.A.A...T.A.G...T...A.A.A.A.T...T...C.A.A.
8 .T.T.A.A...T.G.A..G.....T.A.A...T.A.G...T...A.A.A.A.T...T...C.A.A.
9 .T.T.A.A...T.G.A..G.....T.A.A...T.A.G...T...A.A.A.A.T...T...C.A.A.
10 .T.T.A.A...T.G.A.....T.A.A...T.A.N...T...A.A.A.A.T...T...C.A.A.
11 .T.T.A.A...T.G.A.....T.A.A...T..N.....N.A.A.A.A.T...T...C.A.A.
12 .T.T.A.A...T.G.A.....T.A.A...T.A.A...T...A.A.A.A.T...T...C.A.A.
13 .T.T.A.A...T.G.A.....T.A.A...T..A.....C.A.A.A.A.T...T...C.A.A.
X                XX                X                X X X

```

Figura 18. Alinhamento das sequências genéticas com as posições variáveis observadas para os 13 haplótipos COI. Os pontos (.) indicam bases não variáveis conforme a sequência do haplótipo I, e as letras representam as variações para cada haplótipo. O “X” abaixo de cada posição indica a alteração do aminoácido traduzido. Observação: não estão representadas todas as variáveis nas bases e a alteração de aminoácidos, pois as sequências apresentavam tamanhos diferentes (ver Tabela 9), e foi utilizada como molde o haplótipo 1.

As primeiras análises do gene *COI* para os exemplares de machos de *Euglossa* revelaram o agrupamento de três clados distintos com origem monofilética (Figura 19). A rede de haplótipos demonstra nitidamente a formação de três clados, com poucas mutações dentro de cada grupo (nenhuma ou até dois sítios polimórficos) e várias mutações entre os grupos (de 2 a 7 sítios polimórficos sinonímicos ou não sinonímicos).

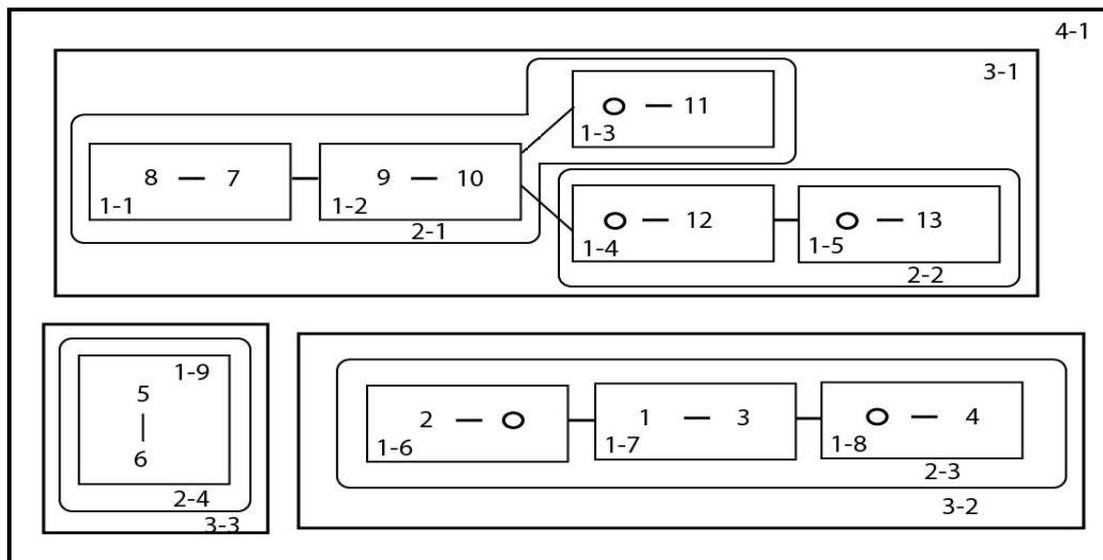


Figura 19. Rede de haplótipos do gene *COI* para população de *Euglossa annectans*. Número de haplótipos representados na Tabela 10. Barras entre haplótipos representam conexões parcimoniosas. Círculos abertos (o) representam haplótipos intermediários que faltam na amostra. Caixas com cantos retos e linhas finas representam 1 passo na rede de haplótipos e 1 clado. Caixas com cantos arredondados e linhas finas representam 2 passos e com até 3 clados aninhados. Caixas com cantos retos e linhas grossas representam 3 passos com mais de 3 clados aninhados, exceto 3-3 que apresenta 2 clados e 3 passos.

A análise de contingência dos haplótipos e 10 fragmentos florestais estudados aqui, mostrou que o um clado (1-1) apresenta associação com a localidade, mas não com o estágio florestal do fragmento já que os haplótipos foram amostrados em floresta madura e secundária. Enquanto que cinco haplótipos (1-2, 1-7, 1-9, 2-1 e 2-2) indicam aninhamento significativo com a variação genética e geográfica (Tabela 9). Este teste indica que três conflitos com a taxonomia atual: primeiro, um único táxon mostra morfoespécies diferentes (por exemplo, *Eg. annectans* com clados 1-2), segundo, morfoespécies intimamente correlacionadas com haplótipos diferentes (por exemplo, *Eg. annectans* com clado 1-1), e terceiro, pressões evolutivas muito parecidas que surgiram mais de uma vez unindo linhagens diferentes (por exemplo, *Eg. annectans* 2-2) (Tabela 9).

Tabela 9. Análise de contingência aninhada a variação genética e geográfica.

Clado	Permutação (chi-quadrado)	Probabilidade
1-1	40	7.599e-06
1-2	15.64	0.003465*
1-7	11.819	0.0005863*
1-9	28.225	0.0002002*
2-1	71.436	0.0003972*
2-2	23.398	0.005362*
2-3	30.588	2-28e-07
3-1	121.42	4.712e-06
4-1	64.358	0.1167

* Valor significativo menor que 0.05.

A análise da matriz de dados moleculares de distância Patrística indica os menores valores entre os haplótipos de cada clado (ver Tabela 9 e Figura 19). A menor distância (0.002) foi observada entre os haplótipos 8 e 9, enquanto que a maior distância (0.067) encontrada entre os haplótipos 6 e 7. O haplótipo 6 foi o que apresentou as maiores distâncias Patrística (entre 0.59 e 0.67) com os haplótipos formados pelo clado A. Por outro lado, os haplótipos 7, 8 e 9 (clado A) estão representados por pequenas distâncias corroborado a hipótese de proximidade entre os grupos (Tabela 10). As distâncias serviram nas análises da matriz de dados moleculares como parâmetro máximo das divergências entre os haplótipos.

Tabela 10. Matrix de distâncias Patrística, divergência no número de substituições (μ) e tempo que ocorreu (t), calculada entre os haplótipos amostrados.

Haplótipo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		0.003	0.008	0.016	0.031	0.044	0.060	0.057	0.056	0.053	0.052	0.055	0.057

2	0.003		0.005	0.014	0.029	0.041	0.058	0.055	0.053	0.051	0.049	0.053	0.055
3	0.005	0.008		0.008	0.023	0.036	0.053	0.049	0.048	0.045	0.044	0.048	0.050
4	0.014	0.016	0.008		0.019	0.032	0.048	0.045	0.044	0.041	0.040	0.043	0.045
5	0.029	0.031	0.023	0.019		0.012	0.055	0.052	0.050	0.048	0.046	0.050	0.052
6	0.041	0.044	0.036	0.032	0.012		0.067	0.064	0.063	0.060	0.059	0.062	0.064
7	0.058	0.060	0.053	0.048	0.055	0.067		0.003	0.005	0.007	0.011	0.011	0.013
8	0.055	0.057	0.049	0.045	0.052	0.064	0.003		0.002	0.004	0.007	0.007	0.010
9	0.053	0.056	0.048	0.044	0.050	0.063	0.005	0.002		0.003	0.006	0.006	0.008
10	0.051	0.053	0.045	0.041	0.048	0.060	0.007	0.004	0.003		0.004	0.004	0.006
11	0.049	0.052	0.044	0.040	0.046	0.059	0.011	0.007	0.006	0.004		0.006	0.008
12	0.053	0.055	0.048	0.043	0.050	0.062	0.011	0.007	0.006	0.004	0.006		0.005
13	0.055	0.057	0.050	0.045	0.052	0.064	0.013	0.010	0.008	0.006	0.008	0.005	

O gênero *Euglossa* forma um agrupamento monofilético na análise realizada (Figura 20). Nesta análise foram incluídos apenas os dados moleculares que revelaram um ramo ancestral de *Euglossa* exclusivo para o gênero indicando inúmeras sinapomorfias moleculares (substituições nucleotídicas). Os resultados da árvore consenso da análise de parcimônia para as amostras geraram 98 passos e a formação de três clados distintos, suportados por 58 sinapomorfias morfológicas. O clado A possui autapomorfia que diferencia dos demais (caráter 1): a presença de abertura circular na sutura coronal e coxim maior circular e inferior externa com coxim quase oblongo esta representado por quatro haplótipos (1, 2, 3 e 4) (ver Tabela 8: haplótipos). O clado B é composto por duas homoplasias comum e exclusiva ao grupo: área occipital na cabeça com pelos em formato de semicírculo, grossos, pretos e não ramificados (caráter 6) e metassoma com pontilhamentos pequenos e homogêneos na superfície dos tergitos (dorsal) (caráter 26), representado por dois haplótipos (5 e 6). O clado C apresenta ramos colapsados representados pelo haplótipo e ramos destacados representados pelos haplótipos 7 e 9 com diferenças de 0.006 0.005, respectivamente (ver tabela 5), a autapomorfia principal que distingue o clado é o coxim da perna posterior com formato ovalado (caráter 12), que varia na coloração e densidade (quantidade) dos pelos no coxim.

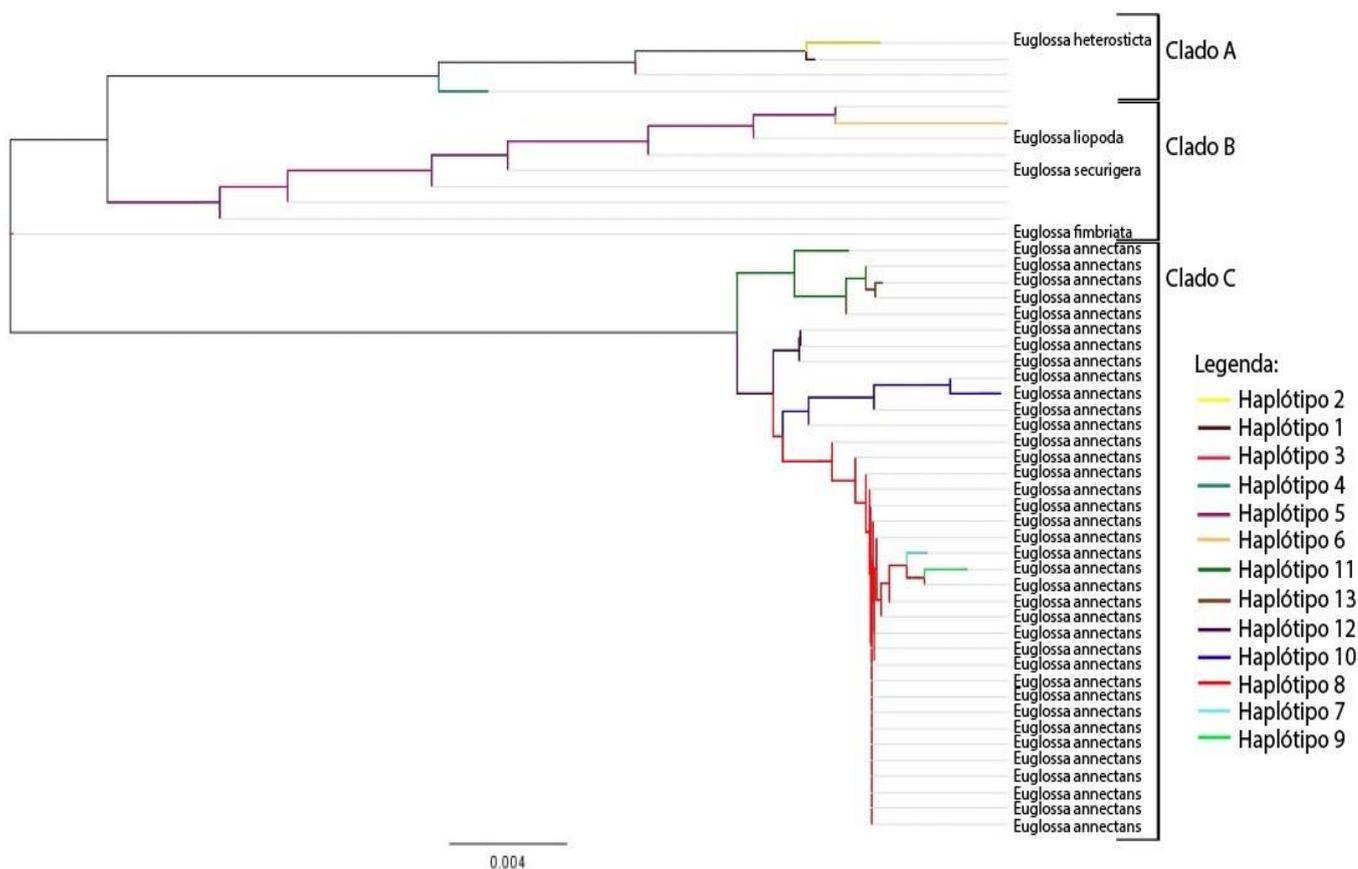


Figura 20. Consenso estrito de três clados e 98 passos mutacionais obtidos através da análise genética. Haplótipos obtidos na amostragem de Euglossina estão representados por cores. Grupo dentro do colchete (]) representa a distinção dos clados.

Características morfológicas

Analisamos 58 caracteres morfológicos de machos do gênero *Euglossa*, cujas sintaxes estão de acordo com (Faria & Melo 2007; Hinojosa-Díaz & Engel 2011; Nemésio & Engel 2012; Ferrari et al. 2017). Os caracteres não observados nos exemplares foi representado por traço (-). Os caracteres contínuos representam o comprimento máximo e a largura máxima da cabeça, tórax e abdômen de cada uma das amostras.

1. Cabeça , sutura coronal, orifício circular: (0) ausente; (1) abertura circular; (2) mancha circular.

2. Cabeça, marcação paraocular, estrutura (faixa branca): (0) ausente; (1) separada por 1mm; (2) separado por 1.5 mm; (3) não separado; (4) separado por 2 mm; (5) não separado e grosso.

3. Antena, escapo, região frontal: (0) preto; (1) branco inteiro; (2) mancha elíptica branco 2.5 mm.
4. Clípeo, superfície, cor: (0) azul; (1) azul esverdeado; (2) verde; (3) verde amarelado; (4) roxo; (5) roxo azulado.
5. Labro, branco area oval escura: (-) ausente; (1) presente.
6. Cabeça, área occipital, disposição dos pelos: (-) ausente; (1) formato de parábola, pelos grossos e preto; (2) formato de parábola, pelos finos e espaçados.
7. Cabeça, área ocellar ocular, vertice (depressão): (-) sem vertice; (1) evidente e profunda; (2) não evidente, mas presente.
8. Cabeça, área ocellar ocular, vértice (depressão), cor: (0) verde; (1) verde amarelado; (2) azul; (3) azul esverdeado; (4) amarelo.
9. Cabeça, comprimento: (0) entre 5 mm e 5.9 mm; (1) entre 6 mm e 6.9 mm.
10. Cabeça, largura: (0) entre 4 mm e 4.9 mm; (1) entre 5 mm e 5.9 mm; (2) entre 6 mm e 6.9 mm.
11. Escutelo, bilobado: (0) não bilobado; (1) bilobado; (2) fracamente bilobado; (3) não bilobado, mas área impunctante (aprofundado).
12. Tibia média, tufo basal e apical: (0) retangular arredondado, margem posterior com pelos espaçados e em uma direção; (1) formato semelhante a 8; (2) formato de C; (3) coxín subovalado e levemente emarginado na borda externa deixando um lobo externo inferior pequeno; (4) lateral levemente emarginado, formato de C; (5) ovaldo com lobo exterior.
13. Tibia média, esporão tibial: (0) ausente; (1) presente e serrilhado fino.
14. Tibia média, fenda tibial, depressão acentuada: (0) pouco mais da metade da extensão da lateral da tibia média; (1) quase toda a lateral da tibia média; (2) toda a lateral da tibia média.
15. Basitarso médio, esporão tibia: (-) ausente; (0) 3 esporões pectinados (dentes mais longos que largos).
16. Basitarso médio, margem proximal, ângulo posterior: (0) agudo; (1) angular; (2) protuberante.
17. Mesoscuto, linha parasidial e mesoscutal, grossura: (0) mesoscutal mais fina que as parasidial; (1) mesoscutal mais grossa que as parasidial; (2) mesoscutal e parasidial mesma grossura; (3) parasidial com formato diferente (“vírgula”).
18. Tegula, superfície, cor: (0) verde; (1) verde azulado; (2) verde azulado; (3) azul com manchas verdes; (4) azul; (5) roxo azulado com manchas verdes.

19. Tegula, pontilhamento (punções) da superfície e região distal lisa, diâmetro e forma: (0) superfície inteira com minúsculas punções (furos) finas e região distal lisa em formato semicírculo; (1) superfície inteira com minúsculas punções finas e região distal lisa em formato de semi-elipse.

20. Mesossoma, superfície, cor: (0) azul esverdeado; (1) verde amarelado; (2) roxo azulado com manchas verdes.

21. Metanoto, forma: (0) laterais estreitas e central alongado com ponta aguda; (1) laterais alargadas e central ponta arredondada colorida; (2) laterais mais alargadas e central com ponta arredondada preto.

22. Tibia média, lado ventral, superfície lisa (não pontilhada): (0) liso e sem pelos longos distal; (1) liso e com pelos longos distal.

23. Mesossoma, comprimento total: (0) entre 4 mm e 4.9 mm; (1) entre 5 mm e 5.9 mm.

24. Mesossoma, largura total: (0) entre 4 mm e 4.9 mm; (1) entre 5 mm e 5.9 mm.

25. T2, largura do tergito: (0) de duas a três vezes mais largo que T1; (1) até um e meio mais largo que T1; (2) de três a quatro vezes mais largo que T1.

26. Metassoma, pontilhamento da superfície dos tergitos (dorsal), diâmetro: (0) punções pequenas e homogêneas; (1) punções grandes e homogêneas; (2) punções pequenas e grandes (heterogêneas).

27. Metassoma, tergitos, linha distal lisa (não pontilhada) e sem pelos: (0) ausente; (1) presente.

28. T1, pontilhamento (punções) da superfície, aspecto (fisionomia): (0) aspecto homogêneo (uniforme), mesmo diâmetro das punções; (1) aspecto heterogêneo (desigual), diâmetros diferentes das punções.

32. Tibia posterior, superfície, cor: (0) verde amarelo; (1) verde; (2) azul; (3) azul esverdeado; (4) azul esverdeado com manchas amarelas; (5) azul arroxado; (6) amarelo dourado.

33. Metassoma, pontilhamento da superfície dos escleritos (ventral), diâmetro: (0) escleritos com lado laterais com punções pequenas e central com punções grandes (aspecto heterogêneo); (1) escleritos com linha na lado apical e central sem punções (liso) e laterais com punções pequenas; (2) escleritos com lado central sem punções (liso) e apical e lateral com punções pequenas.

34. Metassoma, superfície dos tergitos (dorsal), cor: (0) T1 azul e demais tergitos verdes; (1) verde-primavera¹ amarelado e últimos três tergitos inteiros amarelos; (2) azul marinho esverdeado; (3) verde-broto; (4) roxo azulado com últimos três tergitos verde-broto.

35. Metassoma, mancha com forma e cor, diferente: (0) nenhum; (1) T4 círculo dourado; (2) T1 triângulo ovalado amarelo.

36. Metassoma, superfície dos escleritos (ventral), cor: (0) verde-primavera amarelado; (1) verde-broto; (2) verde-primavera azulado; (3) amarelo com manchas verdes e laranjadas; (4) roxo azulado.

38. Metassoma, escleritos (ventral), disposição dos pelos, comprimento, quantidade e lado: (0) curtos, poucos nas laterais dos escleritos; (1) longos, muito e finos nas laterais dos escleritos; (2) longos, pouco e finos nas laterais e basal dos escleritos.

39. Basitarso posterior, concavidade: (0) concavo; (1) semi concavo.

40. Basitarso posterior, pontilhamento da superfície, diâmetro: (0) proximal sem punções (liso) e distal com punções pequenos e distantes; (1) sem punções (superfície inteira lisa); (2) superfície inteira com punções.

41. Basitarso posterior, tufo de pelos, disposição: (0) sem pelos; (1) pelos no lado distal; (2) pelos por toda superfície.

42. Basitarso posterior, superfície, cor: (0) verde-broto; (1) azul marinho; (2) verde-primavera azulado.

44. Tibia posterior, franja pos-glandular, comprimento dos pelos: (0) curto; (1) médio; (2) longo; (3) muito longo.

45. Tibia posterior, franja pos-glandular, quantidade de pelos na franja: (0) pouco; (1) médio; (2) muito.

46. Tibia posterior, superfície interna, pontilhamento: (0) sem punções (liso); (1) com punções.

47. Tibia posterior, superfície interna, comprimento dos pelos: (0) sem pelos; (1) pelos curtos; (2) pelos médios.

48. Tibia posterior, superfície interna, concavidade: (0) não concava; (1) concava.

49. Basitarso posterior, superfície interna, triângulo proximal: (0) triângulo ausente; (1) triângulo grande, abrange quase toda o lado apical proximal; (2) triângulo pequeno no lado apical proximal.

50. Basitarso posterior, superfície interna, tufo de pelos sobre uma protuberância aguda: (0) presente.

53. Tibia posterior, superfície interna, tufo de pelos distal: (0) ausente; (1) presente.
56. Tibia posterior, esporão tibial, protuberancia basal: (0) ausente; (1) presente.
57. Metassoma, comprimento total: (0) entre 4 mm e 4.9 mm; (1) entre 5 mm e 5.9 mm; (2) entre 6 mm e 6.9 mm.
58. Metassoma, largura total: (0) entre 6 mm e 6.9 mm; (1) entre 7 mm e 7.9 mm; (2) entre 8 mm e 8.9 mm; (3) entre 9 mm e 9.9 mm; (4) entre 10 mm e 10.9 mm.

Discussão

A definição exata de espécies é uma temática amplamente discutida no meio científico, e as relações genéticas entre os grupos vêm sendo frequentemente revistas após a popularização dos métodos de análises moleculares (Ramírez et al. 2010, Nemésio & Engel 2012, Ferrari et al. 2014, Quezada-Euán et al. 2015, Nguyen & Gómez-Zurita 2015, Ferrari et al. 2017). Algumas relações entre os nós de *Eg. annectans* devem ser apreciadas com cautela já que as características morfológicas podem representar caracteres que surgiram mais de uma vez (homoplasias). As análises realizadas esclareceram discrepâncias morfológicas e as inter-relações dentro de *Eg. annectans*, além de revelar possíveis autapomorfias morfológicas para algumas taxas. Os resultados das análises genéticas também revelaram que, o grupo *Eg. annectans* parece não ser o único com problemas taxonômicos, estudos que almejem avaliar estas inter-relações entre espécies de *Euglossa* deveriam considerar amostragem de taxas externos. Recentemente, Ferrari et al. (2017) investigaram a inter-relação entre as linhagens do gênero *Euglossa* (com ênfase em *Glossura* e *Glossuropoda*) baseados em dados morfológicos e sequências de DNA, fornecendo sinapomorfias para *E. (Glossura)* e *E. (Glossuropoda)* pela primeira vez.

Estudos filogenéticos recentes destacam grupos tradicionalmente reconhecidos com prováveis relações monofiléticas entre subgêneros e espécies, além de revelarem os grupos cujo monofiletismo é questionável (Roubick 2004; Ramírez et al. 2010, Freiria et al. 2012; Ferrari et al. 2014). Devido à baixa abundância de *Eg. annectans* nos fragmentos florestais do bioma Cerrado e área de transição, o número ideal de amostras foi menor que o esperado neste estudo, devido a isto a amplitude das análises realizadas e propostas possibilitam uma interpretação dos resultados suficientemente sensível para resgatar a evolução das taxas interespecíficas de *Euglossa*.

Euglossa annectans foi descrita por Dressler (1982) sugerindo uma relação filogenética existente entre *E. (Euglossa)* e *E. (Glossura)*, devido ao fato da espécie apresentar características morfológicas compartilhadas entre os dois grupos, também sugerido por Rebêlo e Moure (1995). No entanto, Roubick (2004) não sustenta a hipótese de *Eg. annectans* pertencer a *Glossura*, mas reconhece a provável relação intermediária entre os subgêneros. Análises incorporando dados morfológicos e moleculares recentes afirmam que *Eg. annectans* não pertence a *Glossura* e que *Eg. annectans* e *Eg. stellfeldi* representem uma taxa irmão de *E. (Euglossa)* + *E. ("Alloglossura")* / *E. ("Glossurella")*, não incluindo as espécies nos subgêneros reconhecidos até o momento, propondo subsequente agrupar os cinco taxas em um subgênero ou erigir um novo subgênero para *Eg. annectans* e *Eg. stellfeldi* (Ferrari et al. 2017).

A diversidade haplotípica não parece estar relacionada com o tamanho da amostra neste estudo, como sugeriram (Freiria et al. 2012; Penha et al. 2014), em virtude de alguns fragmentos apresentam dois ou três exemplares com haplótipos distintos e distâncias genéticas significativas. Neste sentido, o teste estatístico de contingência aninhado à variação genética e geográfica foi significativo entre os haplótipos com maior distância genética e passos mutacionais (ver [Tabela 9-10](#) e [Figura 20](#)).

Apesar das relações filogenéticas entre grupos (gêneros, tribos) representarem propostas com menor “impacto” na classificação, para o entendimento da história evolutiva o esclarecimento dos passos intraespecíficos e a reconstrução filogenética compõe os mesmos benefícios científicos que qualquer outro grupo (gênero, subgênero, etc) (Ferrari et al. 2014). Devido ao modo particular na atratividade sexual de Euglossina, sinais de acasalamento químicos (Rêbello & Cabral 1997, Nunes et al. 2016), espécies desta subtribo poderiam ter divergido sem substâncias morfológicas substâncias e caracteres específicos (Eltz et al. 2008), neste sentido, o uso de dados morfológicos e genéticos podem esclarecer lacunas na taxonomia tradicional.

Portanto, as análises dão suporte ao reconhecimento de entidades biológicas distintas dentro do grupo *Eg. annectans* com evidências genéticas e análise de contingência significativos que corroboram para distinção evolutiva. Além disto, encontramos que *Eg. annectans* não parece ser o único grupo com discrepâncias taxonômicas refletidas em caracteres morfológicos intraespecíficos, como constado para os clados A e B.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a pesquisadora Dr. Anabela Cardoso pela assistência e ajuda nas extrações e sequenciamento. Agradeço também a toda a direção do CSIC, Branca, Ana, Izabel, técnicos (as) administrativos (as) e demais membros da equipe de direção do CSIC que me apoiaram e auxiliaram na resolução das minhas dúvidas. Agradeço a colega Helene pelas dicas e ajuda no CSIC. Agradeço a UFGD pela disponibilidade das amostras concedidas, assim como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro a bolsa do doutorado sanduíche, e também ao Conselho Superior de Investigação Científica (CSIC) pela concessão da vaga, auxílio nos documentos e disponibilidade do laboratório e pesquisador para orientação.

Referências

- Aguiar, W.M.; Gaglianone, M.C. 2012. Euglossini bee communities in small forest fragments of the Atlantic Forest, Rio de Janeiro state, southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 56(2): 210-219. doi:10.1590/S0085-56262012005000018
- Barraclough, T.G; Hogan, J.E.; Vogler, A.P. 1999. Testing whether ecological factors promote cladogenesis in a group of tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae). *Proc. R. Soc. Lond. B* 266: 1061-1067.
- Boscolo, D.; Tokumoto, P.M.; Ferreria, P.A.; Ribeiro, J.W.; Santos, J.S. 2017. Positive responses of flower visiting bees to landscape heterogeneity depend on functional connectivity levels. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 15: 18-24. doi:10.1016/j.pecon.2017.03.002.
- Brito, R.B.; Francisco, F.O.; Françoso, E.; Santiago, L.R.; Arias, M.C. 2013. Very low mitochondrial variability in a stingless bee endemic to Cerrado. *Genetics and Molecular Biology*, 36, 1, 124-128. doi: 10.1590/S141547572013000100018
- BRASIL. 2009. Caderno de Licenciamento Ambiental. Programa Nacional de Capacitação de gestores ambientais: licenciamento ambiental / Ministério do Meio Ambiente. – Brasília: MMA, 2009.

- BRASIL. 2010. Floresta Atlântica Manual de Adequação Ambiental. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Departamento de Conservação da Biodiversidade Núcleo Floresta Atlântica e Pampa. Brasília: MMA/SBF, 2010.
- Clary, D.O.; Wolstenholme, D.R. 1985. The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution* 22(3): 252–271.
- Clement, M.; Posada, D.; Crandall, K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660.
- Dodson, C.H.; Dressler, R.L.; Hills, H.G.; Adams, R.M.; Williams, N.H. 1906. Biologically active compounds in orchid fra-grances. *Science*, 164, 1243–1249.
- Dressler, R.L. 1978. New species of *Euglossa* from Mexico and Central America. *Revista de Biologia Tropical*, 26: 167–185.
- Dressler, R.L. 1982. New species of *Euglossa*: II. (Hymenoptera: Apidae). *Revista de Biologia Tropical*, 30: 121–129.
- Eltz, T.; Bause, C.; Hund, K.; Quezada-Euan, J.J.G.; Pokorny, T. 2015. Correlates of perfume load in male orchid bees. *Chemoecology*, 25(4): 193-199. doi: 10.1007/s00049-015-0190-9
- 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). *Revista Brasileira de Entomologia*, 51: 275–284.
- Ferrari, B.R.; Melo, G.A.R. 2014. Deceiving colors: recognition of color morphs as separate species in orchid bees is not supported by molecular evidence. *Apidologie*, 45:641–652. Doi: 10.1007/s13592-014-0280-7
- Ferrari, R.R.; Nemésio, A.; Silveira, F.A. 2017. Phylogeny of the orchid-bee genus *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae), with emphasis on the subgenera *E. (Glossura)* Cockerell and *E. (Glossuropoda)* Moure. *Zoologischer Anzeiger* 267:82–100. Doi: dx.doi.org/10.1016/j.jcz.2017.02.005
- Ferronato, M.C.F.; Giangarelli, D.C.; Mazzaro, D.; Uemura, N.; Sofia, S.H. (2017). Orchid Bee (Apidae: Euglossini) Communities in Atlantic Forest Remnants and Restored areas in Paraná State, Brazil. *Neotropical Entomology*, 47(3): 352-361. doi: 10.1007/s13744-017-0530-2
- Freiria, G.F.; Ruim, J.; Souza, R.; Sofia, S. 2012. Population structure and genetic diversity of the orchid bee *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) from Atlantic Forest

- remnants in Southern and southeastern Brazil. *Apidologi*, 43:392-402. doi: 10.1007/s13592-011-0104-y
- 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: 71-83. doi: I: 10.1007/s13592-014-0303-4
- 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. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 54(6): 63-68.
- Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Bal, S.; Dewaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London (B)* 270: 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hinojosa-Díaz, I.A.; Engel, M.S. 2012. Revision of the orchid bee subgenus *Euglossella* (Hymenoptera, Apidae), Part I, The *decorata* species group. *ZooKeys* 140: 27–69. doi: 10.3897/zookeys.140.1923
- IBAMA. 1991. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. PORTARIA N.º 83-N, DE 26 DE SETEMBRO DE 1991 - In: Resoluções, 1991. Retrived from: http://www.mp.go.gov.br/nat_sucroalcooleiro/Documentos/legislacao/Geral/florestas/flo10. (Accessed on 05 September 2016).
- Lunt, D.H.; Zhang, D.X.; Szymura, J.M.; Hewitt, G.M. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, 5(3): 153–165.
- Michener, C.D. 1990. Classification of the Apidae (Hymenoptera). *University of Kansas Science Bulletin*, 54 (4): 75-164.
- Michener, C.D. 2007. *The Bees of the World*. Second Edition. Johns Hopkins
- Morato, E.F. 1994. Abundância e riqueza de machos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em mata de terra firme e áreas de derrubada, nas vizinhanças de Manaus (Brasil). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Zoologia*, 10(1): 95-105.
- Moreira, E.F.; Boscolo, D.; Viana, B.F. 2015. Spatial Heterogeneity Regulates Plant-Pollinator Networks across Multiple Landscape Scales. *PLOS ONE*, 10(4): e0123628. doi:10.1371/journal.pone.0123628
- Nemésio, A. 2009. Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest. *Zootaxa*, Auckland. 2041: 1–242.

- Nemésio, A.; Engel, M.S., 2012. Three new cryptic species of *Euglossa* from Brazil (Hymenoptera, Apidae). *ZooKeys*, 222: 47–68.
- Nemésio, A.; Ferrari, R.R. 2012. *Euglossa (Glossura) bazinga* sp. n. (Hymenoptera: Apidae: Apinae, Apini, Euglossina), a new orchid bee from western Brazil, and designation of a lectotype for *Euglossa (Glossura) ignita* Smith, 1874. *Zootaxa*, 3590: 63–72.
- Nemésio, A.; Rasmussen, C. 2011. Nomenclatural issues in the orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossina) and an updated catalogue. *Zootaxa*, 3006, 1–42.
- Nguyen, D.T.; Gómez-Zurita, J. 2016. Subtle Ecological Gradient in the Tropics Triggers High Species-Turnover in a Local Geographical Scale. *PLoS ONE* 11(6): e0156840. doi:10.1371/journal.pone.0156840
- Nunes, C.E.P.; Peñaflores, M.F.G.V.; Bento, J.M.S.; Salvador, M.J.; Sazima, M. 2016. The dilemma of being a fragrant flower: the major floral volatile attracts pollinators and florivores in the euglossine-pollinated orchid *Dichaea pendula*. *Oecologia*, 182:933-946. doi: 10.1007/s00442-016-3703-5
- Penha, R.E.S.; Gaglianone, M.C.; Almeida, F.S.; 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.
- Quezada-Euán, J.J.G.; Sheets, H.D.; Luna, E.; Eltz, T. 2015. Identification of cryptic species and morphotypes in male *Euglossa*: morphometric analysis of forewings (Hymenoptera: Euglossini). *Apidologie*, 46(6):787-795. DOI: 10.1007/s13592-015-0369-7
- Ramalho, A.V.; Gaglianone, M.C.; Oliveira, M.L. 2009. Comunidades de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em fragmentos de Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 53(1): 95-101. doi: 10.1590/S0085-56262009000100022
- Ramalho, A.V.; Gaglianone, M.C.; Oliveira, M.L. 2009. Comunidades de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em fragmentos de Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 53(1): 95-101. doi: 10.1590/S0085-56262009000100022
- Ramírez, S.R.; Roubik, D.W.; Charlotte, S.; Pierce, N.E. 2010. Phylogeny, diversification patterns and historical biogeography of euglossine orchid bees (Hymenoptera: Apidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 100: 552–572.
- Raw, A. 1989. The dispersal of Euglossini bees between isolated patches of eastern Brazilian wet forest (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomol*, 33(1): 103-107.
- Rebêlo, J.M.M.; Cabral, A.J.M. 1997. Abelhas Euglossinae de Barreirinhas, zona do litoral da Baixada Oriental Maranhense. *Acta Amazonica*. 27(2): 145-152.

- Rebêlo, J.M.M.; Moure, J.S. 1996. As espécies de *Euglossa* Latreille do nordeste de São Paulo (Apidae, Euglossinae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 12: 445–466.
- Ribeiro, M.C.; Metzger, J.P.; Martensen, A.C.; Ponzoni, F.; Hirota, M.M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142(6): 1141–1153. doi: 10.1016/j.biocon.2009.02.021
- Ribeiro, M.C.; Metzger, J.P.; Martensen, A.C.; Ponzoni, F.; Hirota, M.M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142(6): 1141–1153. doi: 10.1016/j.biocon.2009.02.021
- Ribera, I.; Fresneda, J.; Bucur, R.; Izquierdo, A.; Vogler, A.P.; Salgado, J.M.; Cieslak, A. 2010. Ancient origin of a Western Mediterranean radiation of subterranean beetles. *BMC Evolutionary Biology* 10: 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-29>.
- Roubik, D.W. 2004. Sibling species among *Glossura* and *Glossuropoda* in the Amazon region (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *J. Kansas Entomol. Soc*, 77: 235–253.
- Saraste, M. 1990. Structural features of cytochrome oxidase. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 23(4): 331–366.
- Silveira, F.A.; Melo, G.A.R.; Almeida, E.A.B. 2002. *Abelhas Brasileiras Sistemática e Identificação*. Fundação Araucária, Belo Horizonte, 253.
- Silveira, G.C.; Nascimento, A.M.; Sofia, S.H.; Augusto, S.C. 2011. Diversity of the Euglossini bee community (Hymenoptera, Apidae) of an Atlantic Forest remnant in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 55(1): 109-115. doi: 10.1590/S0085-56262011000100017
- Simon, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.T.; Crespi, B.; Liu, H. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 87: 651-701.

Considerações finais

No geral, a regeneração florestal próximo a remanescentes parece favorecer a reintegração da comunidade de abelhas Euglossini. Paisagens contínuas favorecem o equilíbrio da comunidade de abelhas das orquídeas, apesar do sucesso na reintegração da comunidade ser dependente de florestas primárias. Outro ponto importante é a complementariedade das essências na atratividade dos gêneros de Euglossini, visando que a escolha do composto pode influenciar na composição e abundância das espécies. Os resultados sugerem que paisagens contínuas próximas a remanescentes florestais são uma medida de conservação atraente para minimizar os efeitos de borda das florestas (Ewers et al. 2013, Bailey et al. 2014), beneficiando as populações destes importantes polinizadores neotropicais.

Nesta perspectiva, as comunidades de abelhas silvestres também parecem não serem significativamente afetadas pela recuperação natural de florestas próximas a florestas maduras (primária), e ainda, estes ambientes parecem favorecer a reintegração das comunidades destas abelhas. Os resultados apresentados corroboram com a hipótese de que as visitas florais estão mais associadas a plantas com flores generalistas, do que com a diversidade de plantas (Shimizu et al. 2014, Salisbury et al. 2015, Dar et al. 2017). Os resultados indicaram que em florestas com comunidades de abelhas silvestres em equilíbrio, a presença de *A. mellifera* não parece interferir nas atividades de forrageamento das abelhas silvestres. A preferência da abelha do mel em áreas de borda com ambientes preservados (floresta madura) é evidente, apesar da causa não ter sido estudada. Portanto, este estudo sugere que estes fatos refletem a importância da recuperação florestal para a comunidade de abelhas silvestres e podem servir como medidas atraentes em ações futuras de recuperação ambiental.

Quanto às análises genéticas e morfológicas realizadas dão suporte ao reconhecimento de entidades biológicas distintas dentro do grupo *Eg. annectans* com evidências genéticas e análise de contingência significativa que corroboram para distinção evolutiva. Além disto, encontramos que *Eg. annectans* não parece ser o único grupo com discrepâncias taxonômicas refletidas em caracteres morfológicos intraespecíficos.

Em suma, podemos concluir que a regeneração natural de florestas pode servir como uma medida de conservação e recuperação de fragmentos florestais, favorecendo a reintegração das comunidades de abelhas e possivelmente diminuindo os efeitos causados pelas bordas das florestas descobertas. Possivelmente esta seja uma alternativa viável e

sustentável para o manejo de florestas e preservação dos ecossistemas fundamentais para a sobrevivência da vida.

Referências gerais

- Aguiar, W.M.; Gaglianone, M.C. 2012. Euglossine bees communities in small forest fragments of the Atlantic Forest, Rio de Janeiro state, southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 56, p. 130-139.
- Alameira, F.S.; Gomes, D.S.; Queiroz, J.M. 2011. Estratégias para a conservação da diversidade biológica em florestas fragmentadas. *Ambiência*, v. 7, n. 2, p. 367-382.
- Antonini, Y.; Silveira, R.A.; Oliveira, M.L.; Martins, C.; Oliveira, R. 2016. Orchid bee fauna responds to habitat complexity on a savanna area (Cerrado) in Brazil. *Sociobiology*, v. 63, n. 2, p. 819-825.
- Bailey, S.; Requier, F.; Nusillard, B.; Roberts, S.P.M.; Potts, S.G.; Potts, C. 2014. Distance from forest edge affects bee pollinators in oilseed rape fields. *Ecology and Evolution*, 4(4): 370-380. ISSN 20457758 doi:10.1002/ece3.924
- Botsch, J.C.; Walter, S.T., Karubian, J.; González, N.; González, E.K.; Brosi, B.J. 2017. Impacts of forest fragmentation on orchid bee (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) communities in the Chocó biodiversity hotspot of northwest Ecuador. *J Insect Conserv.* 21, 633-643. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10841-017-0006-z>
- BRASIL. 2010. Mata Atlântica: manual de adequação ambiental. Brasília: MMA/SBF, 2010. 96p.
- Brittain, C.A.; Vighi, M.; Bommarco, R.; Settele, J.; Potts, S.G. 2010. Impacts of a pesticide on pollinator species richness at different spatial scales. *Basic and Applied Ecology*, v. 11, n. 2, p. 106–115.
- Cane, J.H. 2001. Habitat fragmentation and native bees: a premature verdict? *Conservation Ecology*, v. 5, n. 1, art. 3.
- Dar, S.A.; Hassan, Gh. I.; Padder, B.A.; Wani, Ab.R.; Parey, S.H. 2017. Pollination and evolution of plant and insect interaction. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6,3,304-311.
- Dobrovolski, R.; Diniz-Filho, J.A.F.; Loyola, R.D.; De Marco, J.P. 2011. Agricultural expansion and the fate of global conservation priorities. *Biodiversity and Conservation*, v. 20, n. 11, p. 2445–2459.

- Ewers, R.M.; Bartlam, S.; Didham, R.K. 2013. Altered species interactions at forest edges: contrasting edge effects on bumble bees and their phoretic mite loads in temperate forest remnants. *Insect Conservation and Diversity*, 6(5): 598-606. doi: 10.1111/icad.12014
- Ferronato, M.C.F.; Giangarelli, D.C.; Mazzaro, D.; Uemura, N.; Sofia, S.H. 2017. Orchid bee (Apidae: Euglossini) communities in Atlantic Forest remnants and restored areas in Paraná State, Brazil. *Neotropical Entomology*, 47: 3, 325-361.
- Forup, M.L.; Memmott, J. 2005. The restoration of plant–pollinator interactions in hay meadows. *Restoration Ecology*, v. 13, p. 265–274.
- Fowler, R.E.; Rotheray, E.L.; Goulson, D. Floral abundance and resource quality influence pollinator choice. *Insect Conserv Diver.* 2016, 9, 481-494. DOI: <https://doi.org/10.1111/icad.12197>
- Gullan, P.J. Cranston, P.S. 2014. *The Insects: an outline of entomology*. illustrations by Karina H. McInnes. – Fifth edition. ISBN 978-1-118-84615-5 (cloth), USA, 632 p.
- Imperatriz-Fonseca, V.L.; Canhos, D.A.L.; Alves, D.A.; Saraiva, A.M. 2012. Polinizadores no Brasil. Contribuição para a biodiversidade, uso sustentado, conservação e serviços ambientais. São Paulo: Universidade de S. Paulo, 488 p.
- Koh, I.; Lonsdorf, E.V.; Williams, N.M.; Brittain, C.; Isaacs, R.; Gibbs, J.; Ricketts, T.H. Modeling the status, trends, and impacts of wild bee abundance in the United States. *PNAS*. 2016, 113, 140-145. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1517685113>
- Larsen, T.H.; Williams, M.N.; Kremen, C. 2005. Extinction order and altered community structure rapidly disrupt ecosystem functioning. *Ecology Letters*, v. 8, p. 538- 547.
- Laurance, W.F.; Vasconcelos, H.L. 2009. Consequências ecológicas da fragmentação florestal na Amazônia. *Oecologia Brasiliensis*, v. 13, p. 434-451.
- Michener, C. D. 2007. *The Bees of the World*. Second Ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 972 p.
- Myrs, N.; Myttermeier, R.A.; Myttermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B.; Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, p. 853–858.
- Neame, L.A.; Griswold, T.; Elle, E. 2013. Pollinator nesting guilds respond differently to urban habitat fragmentation in an oak-savannah ecosystem. *Insect Conserv Diver*, 6, 57-66. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1752-4598.2012.00187.x>
- 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. *Brazilian Journal of Biology*, v. 74, n. 1, p. 16-22.

- Otto, C.R.V.; Roth, C.L.; Carlson, B.L.; Smart, M.D. Land-use change reduces habitat suitability for supporting managed honey bee colonies in the Northern Great Plains. *PNAS*. 2016, 113, 10430-10435. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1603481113>
- Rafael; G.A.R. Melo; C.J.B. de Carvalho; S.A. Casari & R. 2012. Constantino. Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia. Ribeirão Preto, Holos Editora, 810p.
- Ramos, F.N.; Santos, F.A.M. 2006. Floral visitors and pollination of *Psychotria tenuinervis* (Rubiaceae): distance from the anthropogenic and natural edges of an Atlantic forest fragment. *Biotropica*, v. 38, n. 3, p. 383-389.
- 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. *Biological Conservation*, v. 142, p. 1141–1153.
- Rocha-Filho, L.C.; Garófalo, C.A. 2013. Community ecology of euglossine bees in the coastal Atlantic Forest of São Paulo State, Brazil. *Journal of Insect Science*, v. 13, p. 1-19.
- Rodrigues, R.R.; Lima, R.A.F.; Gandolfi, S.; Nave, A.G. 2009. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Conservation*, v. 142, p. 1242–1251.
- Salisbury, A.; Armitage, J.; Bostock, H.; Perry, J.; Tatchell, M. Thompson, K. 2015. Enhancing gardens as habitats for flower-visiting aerial insects (pollinators): should we plant native or exotic species? *Journal of Applied Ecology*, v. 52, p. 1156-1164. DOI: [10.1111/1365-2664.12499](https://doi.org/10.1111/1365-2664.12499).
- Shimizu, A.; Dohzono, I.; Nakaji, M.; Roff, D.A.; Miller III, D.G.; Osato, S.; Yajima, T.; Niitsu, S.; Utsugi, N.; Sugawara, T.; Yoshimura, J. 2014. Fine-tuned Bee-Flower Coevolutionary State Hidden within Multiple Pollination Interactions. *Scientific Reports*, 4, 3988. DOI: [10.1038/srep03988](https://doi.org/10.1038/srep03988).
- Silva, G.B.S.; Mello, A.Y.I.; Steinke, V.A. 2012. Unidades de conservação no bioma Cerrado: Desafios e oportunidades para a conservação no Mato Grosso. *Geografia*, v. 37, n. 3, p. 541-554.
- Silva-Pereira, V.; Santos, G.M.M. 2006. Diversity in bee (Hymenoptera: Apoidea) and social wasp (Hymenoptera: Vespidae, Poistinae) community in “Campos Rupestres”, Bahia, Brasil. *Neotropical Entomology*, v. 35, n. 2, 165-174.
- 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*, v. 46, n. 2, p. 197-208.