

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“Estrutura sociogenética intranidal e estrutura populacional de *Centris (Heterocentris) analis* (Fabricius, 1804) e *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith 1874 (Hymenoptera: Apidae)”

Camilla Helena da Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Entomologia

RIBEIRÃO PRETO – SP

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“Estrutura sociogenética intranidal e estrutura populacional de *Centris (Heterocentris) analis* (Fabricius, 1804) e *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith 1874 (Hymenoptera: Apidae)”

Camilla Helena da Silva

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Entomologia

RIBEIRÃO PRETO – SP

2010

“Os obstáculos existem por algum motivo, não estão ali para nos impedir de irmos atrás de nossos sonhos. Eles existem para nos dar uma chance de mostrarmos a força de nossas aspirações.” Randy Pausch

**Dedico esta dissertação à minha família**

**e aos meus amigos.**

## **Agradecimentos**

*Agradeço primeiramente à minha mãe, meu pai e meu irmão, que sempre me ajudaram muito, dando-me todo amor e carinho. Muito obrigada, amo muito vocês!*

*Ao meu professor e orientador Prof. Dr. Marco Antônio Del Lama, pois ele me acolheu desde a iniciação científica e, inclusive, se associou a outro programa de pós-graduação para que eu pudesse fazer o mestrado. Nesse tempo que estive no seu grupo de trabalho, sempre recebi apoio e aprendi muito sobre seriedade, honestidade e compromisso. Outro ensinamento foi sempre ter força e honra nessa vida e fazer do seu trabalho um grande prazer para, dessa forma, fazê-lo bem feito.*

*Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo, meu co-orientador, que foi fundamental no meu trabalho, auxiliando-me na obtenção de amostras e dando-me boas idéias para esta dissertação. Além, é claro, de me acolher em Ribeirão Preto e me ensinar muito com sua calma, compreensão e gentileza.*

*À minha família, primeiramente minha querida avó Helena, que me fez companhia na maioria dos domingos durante o mestrado, com sua comidinha sempre deliciosa e várias partidas de dominó. Gostaria de agradecer também a todos os meus tios e tias queridíssimos, tia Neiva (Conso) e tio Mário, tia Nilza e tio Marquinhos, tia Sandra e Layrton, tia Geralda, tio Pedro e Marlise, tio João e tia Cleuza (in memoriam) que sempre estiveram muito presentes e dispostos a ajudar no que fosse preciso. E também aos meus primos, que pela proximidade, são vários irmãos pelos quais tenho muito amor e carinho e sinto muitas saudades.*

*À Isabel, que me ajudou muito em todas as análises alozímicas e também foi muito agradável na convivência do laboratório. Agradeço aos amigos que fiz no Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros, Rogério, Thaís, Amanda, Vanessa, Luci, Mariana, Otávio, Margarita, Natália, Keize, Juliano, Cintia, Kátia, Antônio, Juliana, Luana, amigos de trabalho, de almoços e diversão; todos certamente me ajudaram e me ensinaram muitas coisas e são responsáveis por pedacinhos dessa dissertação.*

*Agradeço também a Thais, Emanuel, Samantha e Regina pela amizade e pelos almoços.*

*A todos os amigos do Programa de Pós em Entomologia que fiz em Ribeirão Preto, Mauro, Flávia, Aline, Ricardo Kawada, Patricia, Cris, Letícia, Ana Luiza, Claudia, Monique, Fernando, Getúlio, Zionete, Yara, e principalmente ao Leo, que me ajudou com as espécies de Centris e alegrou minhas tardes em Ribeirão Preto. Além da Renata, da Sandrinha e da Inês que sempre me ajudaram a resolver as burocracias necessárias. Também aos professores Dalton, Evandro, Márcia, Zilá, Cláudio e Pitágoras pelos ensinamentos nas muito proveitosas disciplinas.*

*A todas as pessoas que dividiram suas vidas e casas comigo e não só no mestrado, mas em todo tempo que morei em São Carlos, que dividiram seus lares comigo, formando famílias, que como de costume brigam, riem, fazem festa, mas que se gostam muito: Clarissa (Maria), Marcelo, Gabriela e Fernanda (moradora honorária) e também a Cíntia Oi, Marina e Mariana (Maricota) e ao agregado Fábio (Toshi) e ainda Natália (meus agradecimentos!), Rafaela, Marian, Andreza, Mônica, Katharine e Mayara (grande companheira). Esses agradecimentos também vão para Carmem, Meire, Bianca e Aloísio, que sempre me hospedaram com muito carinho em Ribeirão Preto, fazendo com que as minhas casas e camas, que já eram muitas por esse Brasil, aumentassem ainda mais.*

*A todos os amigos de São Bernardo, muito dos quais a distância e o tempo acabou afastando, mas que certamente fizeram parte da minha caminhada para a faculdade, estando de uma ou outra forma presentes neste momento, mas especialmente a Evelyn, amiga de longa data que sempre esteve presente (graças à internet) em todos os momentos da minha graduação, a Leo e a Karina.*

*A todas as meninas do Titânicas e do futebol das terças à noite, que garantiram muita diversão, muita serotonina e também muitos roxos.*

*E como não podia deixar de ser, um obrigado aos amigos de longa data, que a mais de sete anos fazem parte da minha vida e que apesar de se distanciarem às vezes, foram muito importantes, inclusive para minha dissertação, Raquel e Cíntia*

*Camila e Juliana que ainda são as melhores companheiras de viagens e aventuras, ao Danilo (Pompe), Danilo (Rubert), Juliano, Fernanda, Fernando, Cíntia Oi, Fábio (Toshi), Daniela, Luci, Vanessa, Mariana, Marina, Letícia, Carolina que tanto fizeram parte da minha graduação, nas festas, almoços, alcaloses no pátio da Biologia e nos longos trabalhos e horas de estudo. Enfim, a todos da turma da Biologia 2003!!*

*Por fim, mas não menos importantes, a todos os amigos que fiz nessa etapa final do meu mestrado e nessa nova etapa da minha vida, todos os analistas ambientais do ICMBio, com quem apesar de ter tido uma convivência curta, mas intensa o bastante e com apoio suficiente para receberem um parágrafo de agradecimento também, principalmente Rosenil, Raimundo, Máira, Marília, Larissa, Roberta, Tiago Rezende, Paulo, Júlio, Camilo, Andrei, Fernanda, Eduardo, Sandro, Juliana, Andréa, Joselice...e tantas outras bolinhas queridas que me incentivaram muito a terminar essa dissertação e que já fazem parte da minha vida. Desculpem todos os outros que não estão aqui nominalmente citados; são tão queridos quanto, mas com esses tenho certeza que dividi as angústias do fim do mestrado.*

*À FAPESP pelo suporte financeiro e ao CNPQ pela bolsa concedida.*



## Resumo

Há um interesse crescente em utilizar os serviços de polinização de espécies nativas em sistemas naturais e agroecossistemas. Entretanto, o pouco conhecimento da diversidade e a identificação dos polinizadores efetivos são problemas a serem superados.

As espécies de abelhas do gênero *Centris* são abelhas nativas, que tem sua distribuição geográfica Neotropical, da Argentina ao sul dos Estados Unidos. A característica mais marcante dessas abelhas é o fato de que são coletoras de óleo floral e apresentam diversas especializações morfológicas e comportamentais que as qualificam como polinizadores efetivos, importantes para manutenção de ecossistemas neotropicais e com grande potencial para utilização na agricultura. É essencial conhecer a biologia reprodutiva e a estrutura populacional das espécies de abelhas para avaliação da viabilidade de seu uso como polinizadores e para o desenvolvimento de estratégias de manejo.

Neste trabalho, como parte do Projeto BIOTA FAPESP (Processo 04/15801-0), estudamos aspectos da biologia da nidificação, como sazonalidade, produtividade, razão sexual e alocação sexual, utilizando a estratégia de oferecer ninhos-armadilha para nidificação. Estes achados foram associados a parâmetros genéticos (estrutura sociogenética intranidal e estrutura genética populacional) estimados por marcadores alozímicos revelados eletroforeticamente em géis de amido, DNA mitocondrial e microssatélites.

Para tal, realizamos coletas em quatro cidades: Araras, São Carlos, Rifaina e Ribeirão Preto, desde setembro de 2006 até fevereiro de 2010. Nestas coletas, obtivemos 422 ninhos fundados por espécies de *Centris* dentre os 2007 ninhos coletados neste período e locais. Os indivíduos que emergiram foram estocados a -20°C e os adultos de *Centris tarsata* e *Centris analis* foram analisados para detecção de variação alozímica e de polimorfismos do DNA mitocondrial.

A partir dos resultados de alozimas pudemos inferir que, conforme o esperado, a prole dos ninhos de *Centris tarsata* é usualmente o resultado do acasalamento de uma fêmea com um macho. Os resultados obtidos em *Centris analis* utilizando alozimas como marcador não foram conclusivos, pois a população analisada não apresentou variantes eletroforéticas geneticamente determinadas.

Em relação à biologia de nidificação, foram confirmados os dados da literatura quanto à sazonalidade das duas espécies. Graças ao acompanhamento da atividade de nidificação realizada por uma população de *Centris analis* durante um ano inteiro de 2009, foi possível observar diferenças significativas ao longo dos meses, principalmente na razão sexual. Essas informações serão úteis para o delineamento de estratégias de manejo de ninhos-armadilha em estudos futuros.

## Abstract

There is an increasing interest in the services of pollination offered by the bees in natural systems and crops. However, the poor knowledge of the diversity and the identification of the effective pollinators are problems to be surpassed.

Bees of the genus *Centris* are native of the Neotropical region and are distributed from Argentina to the southern United States. The most striking feature of these bees is the fact that they collect floral oils, exhibiting many morphological and behavioral adaptations that qualify them as effective pollinators of neotropical ecosystems. So, it is essential to understand the reproductive biology and the population structure of the species of bees for evaluation of the viability of their use as pollinators and for the development of handling strategies.

In this work, as part of the Project BIOTA FAPESP (Process 04/15801-0), we studied aspects of the nesting biology such as seasonality, productivity, sexual ratio and sex allocation, using the strategy to offer nest-traps for nest building. These findings were associated to genetic analysis (intranidal sociogenetic structure and population genetic structure) conducted with allozymes, and mitochondrial and nuclear (microsatellite) markers.

Samples were collected in four cities: Araras, São Carlos, Rifaina and Ribeirão Preto, from September 2006 until February 2010. From these samples, we collected 422 nests founded by *Centris* females. Individuals that emerged were stored at -20°C until DNA extraction and adults of *Centris analis* and *Centris tarsata* were analyzed for detection of allozymic and mitochondrial variation.

As expected, the allozymes showed that the *Centris tarsata* offsprings are usually the result of a single mating by the female. The results of *Centris analis* using allozymes markers were not conclusive, because this marker showed no electrophoretic variants in this population. Data from the nesting biology corroborated the literature concerning the seasonality of both species. The observation of nesting activity of *Centris analis* during a year enabled us to observe significant differences over the months, mainly in the sex ratio. Information obtained in this work will be useful to outline strategies for management of trap nests in future studies.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema representando partenogênese arrenótoca com a ploidia de machos e fêmeas.....20
- Figura 2. Filogenia das famílias de Aculeata (Brothers 1999), obtida a partir de caracteres morfológicos.....21
- Figura 3. Árvore dos corbiculados baseada em caracteres genéticos e morfológicos, mostrando a relação de *Centris* com o grupo (CAMERON & MARDULYN, 2001).....22
- Figura 4. Espécime de *Centris* sp em flor de Malpighiaceae.....23
- Figura 5. Elaióforos de Malpighiaceae (COSTA *et al.* 2006).....24
- Figura 6. Em azul claro, as áreas de ocorrência de *Centris analis*, segundo o catálogo de abelhas Moure .....29
- Figura 7. Em azul claro, áreas de ocorrência de *Centris tarsata*, segundo o catálogo de abelhas Moure.....30
- Figura 8. Sítios de coleta de ninhos de *Centris analis* e *Centris tarsata* no campus UFSCar, em Araras.....31
- Figura 9. Sítios de coleta de ninhos de *Centris analis* e *Centris tarsata* na Fazenda Rio Branco, em Rifaina.....32
- Figura 10. Sítios de coleta de ninhos de *Centris analis* e *Centris tarsata* no campus UFSCar, em São Carlos.....32
- Figura 11. Sítio de coleta de ninhos de *Centris analis* e *Centris tarsata* na FFCLRP-USP, em Ribeirão Preto.....33

Figura 12. Ninhos-armadilha de colorset em bloco de madeira e em bambu .....	35
Figura 13. Formas de armazenamento no laboratório de ninhos-armadilha de “colorset” e bambu.....	35
Figura 14. Ninho de <i>Centris tarsata</i> em bambu já aberto, mostrando claramente cada uma das células.....	44
Figura 15. Ninhos de <i>Centris tarsata</i> coletados no período 2006/2007. Data da coleta (círculo cheio) e emergência (círculo vazio). Indivíduos de um mesmo ninho estão delimitados por colchetes com o número de identificação do ninho.....	46
Figura 16. Ninhos de <i>Centris tarsata</i> coletados no período 2007/2008. Data da coleta (círculo cheio) e de emergência (círculo vazio). Indivíduos de um mesmo ninho estão delimitados por colchetes com o número de identificação do ninho.....	47
Figura 17. Ninho de <i>Centris analis</i> em tubo colorset com o óleo floral utilizado no fechamento do ninho, aparente.....	49
Figura 18. Histograma representando a quantidade de machos e fêmeas de <i>Centris analis</i> que passaram a noite em cavidades nos suportes para ninhos-armadilha durante ano de 2009.....	50
Figura 19. Fenologia dos ninhos de <i>Centris analis</i> durante 13 meses, de 5/fevereiro de 2009 a 5/fevereiro de 2010.....	51
Figura 20. Variantes eletroforéticas de 6-fosfogliconato desidrogenase (6-PGD) após eletroforese em gel de amido a 14% em tampão TC pH 7.5 e coloração histoquímica.....	57
Figura 21. Variantes eletroforéticas de $\beta$ -Hidroxiacetato desidrogenase ( <i>Hbdh</i> ) em gel de amido a 14% reveladas histoquimicamente.....	57

Figura 22. Variantes eletroforéticas de isocitrato desidrogenase ( <i>Icd</i> ) em gel de amido a 14% em tampão TC pH7.5 .....	58
Figura 23. Variantes eletroforéticas de Peptidases ( <i>Pep-A</i> ) em gel de amido a 14% em tampão TCB, reveladas histoquimicamente.....	58
Figura 24. Fragmento amplificado por PCR correspondente à região <i>cyb b</i> de <i>Centris tarsata</i> .....	60
Figura 25. Fragmento amplificado por PCR correspondente à região <i>cyb b</i> . As amostras correspondem a: 1-3: <i>Centris tarsata</i> ; 4-8: <i>Centris analis</i> ; 9: <i>Apis mellifera</i> .....	61
Figura 26. Padrões de digestão de <i>Cyt b</i> com <i>DraI</i> . As amostras 1-13 correspondem a <i>Centris tarsata</i> ; de 14-18, <i>Centris analis</i> e 19, <i>Apis mellifera</i> .....	61
Figura 27. Gel de agarose 1% corado com GelRed para revelar fragmento do gene <i>COI</i> amplificado por PCR em amostras de <i>Centris analis</i> .....	62
Figura 28. Testes dos primers de microssatélites de <i>Tripoxylon albitarse</i> Talb 02 e Talb 03, respectivamente, em famílias de <i>Centris analis</i> .....	64
Figura 29. Testes dos primers de microssatélites de <i>Tripoxylon albitarse</i> Talb 05 e Talb 07, respectivamente, em famílias de <i>Centris analis</i> .....	64
Figura 30. Número de indivíduos e distribuição dos valores de massa (em mg) em machos de <i>Centris tarsata</i> .....	66
Figura 31. Número de indivíduos e distribuição dos valores de massa (em mg) das fêmeas de <i>Centris tarsata</i> .....	66
Figura 32. Gráfico mostrando linhas de tendência do total de indivíduos emergidos de <i>Centris analis</i> , pluviosidade e temperatura ao longo do ano de 2009.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características climáticas das cidades em que foram realizadas coletas de ninhos de <i>Centris analis</i> e <i>Centris tarsata</i> estabelecidos em ninhos-armadilha.....	31
Tabela 2- Localidades e número de amostras de <i>Centris analis</i> e <i>Centris tarsata</i> de outras regiões do Brasil.....	34
Tabela 3- Sistemas enzimáticos analisados eletroforeticamente em amostras de <i>Centris ssp.</i> (machos e fêmeas adultos) para detecção de polimorfismos genéticos.....	37
Tabela 4- Resumo dos dados de emergência, mortalidade e parasitismo em <i>Centris tarsata</i> amostrada com ninhos-armadilha (n = 32) provenientes de Araras.....	44
Tabela 5 - Dados de emergência, mortalidade e parasitismo em <i>Centris analis</i> obtidos de ninhos-armadilha provenientes de Ribeirão Preto.....	50
Tabela 6 – Número de indivíduos emergidos dos ninhos de <i>Centris analis</i> no período de 2009/2010.....	52
Tabela 7 - Números de emergências de machos e fêmeas de <i>Centris analis</i> separados somente pelas duas estações: quente e úmida, fria e.....	53
Tabela 8- Sistemas enzimáticos com sua migração no gel e presença (sim) ou ausência (--) de variação.....	55
Tabela 9 - Fêmeas e machos emergidos e razão sexual em <i>Centris analis</i> .....	68
Tabela 10 - Coeficiente de Correlação de Pearson que relacionam a quantidade de indivíduos de <i>Centris analis</i> que emergiram com as condições climáticas: pluviosidade e temperatura.....	69

Tabela 11- Tempo (em dias) de desenvolvimento médio de *Centris analis*, do fechamento do ninho à emergência dos imagos.....70

Tabela 12- Coeficiente de Correlação de Pearson entre temperatura e tempo de desenvolvimento (da oviposição à emergência) de *Centris analis* e pluviosidade e tempo de desenvolvimento.....71



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 Sistemática de Hymenoptera e a tribo Centridini.....	20
1.2 Importância das abelhas.....	25
<b>2.OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
3.1 Material.....	29
3.2 Área de estudo.....	30
3.3 Estratégias de amostragem para biologia de nidificação.....	34
3.4 Análises genéticas.....	36
3.4.1 Alozymas.....	36
3.4.2 DNA mitocondrial.....	38
3.4.3 Análise de sequências.....	39
3.4.4 RFLP- PCR do DNA mitocondrial.....	39
3.4.5 Microssatélites.....	39
3.5. Análise de dados.....	40
3.5.1 Dados genéticos.....	40
3.5.2 Dados ecológicos.....	41
3.5.2.1 Razão sexual (rs).....	41
3.5.2.2 Sazonalidade.....	41
3.5.2.3 Desenvolvimento.....	41
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
4.1 Biologia de nidificação.....	43

4.2 Análise genética.....	53
4.2.1 Análise alozimica.....	53
4.2.2 RFLP-PCR do DNA mitocondrial.....	60
4.2.3 DNA mitocondrial e microsatélites.....	62
4.3 Análise de dados.....	65
4.3.1 Dados genéticos.....	65
4.3.2 Dados ecológicos.....	66
4.3.2.1 Razão sexual.....	66
4.3.2.2 Sazonalidade.....	68
4.3.2.3 Desenvolvimento.....	70
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>79</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>91</b>

## 1. Introdução

A classe Hexapoda ou, mais especificamente, os insetos tiveram sua origem há 400 milhões de anos, sendo provavelmente os primeiros animais terrestres. Tais animais não só são os primeiros, mas os que apresentam maior diversidade entre os seres vivos. Toda essa diversidade faz com que esse táxon tenha uma ecologia muito diversa e ocupe os mais diversos habitats, dominando as redes tróficas em grande número e volume (GRIMALDI & ENGEL 2005). Essas características tornam os insetos muito bem sucedidos, pois o sucesso de um grupo pode ser mensurado tanto por sua quantidade de organismos, quanto pela quantidade de espécies; nesses dois quesitos, nenhum outro grupo supera os insetos (GILLOTT 2005).

A importância dos insetos não se restringe aos ecossistemas naturais, pois os mesmos têm grande influência sobre nossa sociedade, principalmente na agricultura (como polinizadores ou pragas), na indústria farmacêutica (como vetores de doenças: febre amarela, malária) (GULLAN & CRASTON 2005). Os insetos são ótimos organismos modelo para as ciências no estudo de diversos processos biológicos, e ainda assim, com tantas utilidades e influência, grande parte dos insetos é desconhecida pelo homem (GULLAN & CRASTON 2005).

Atualmente contamos com aproximadamente um milhão de espécies descritas (nomeadas) (RESH & CARDÉ 2003). Contudo, as estimativas existentes diferem muito; há as que chegam a valores de dois milhões, como a de Hodkinson & Casson (1991) até as que estimam 8,5 milhões de insetos, como Stork (1996). De toda essa diversidade, a maior parte se agrupa nas ordens hiperdiversas, também chamadas de “big four”, que são Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera que, juntas, compreendem mais de 900.000 espécies descritas (GRIMALDI & ENGEL 2005).

Todo esse sucesso deve-se, provavelmente, a características que os possibilitaram a exploração de novos nichos, já que essas quatro ordens possuem holometabolia. Entretanto, existem algumas controvérsias se somente o fato de possuir larva poderia ser a principal causa de tamanho sucesso (GRIMALDI & ENGEL 2005). Das quatro grandes ordens, uma das mais estudadas principalmente

devido ao grande impacto causado na economia por suas espécies é a Ordem Hymenoptera.

A ordem Hymenoptera é, além dos Strepsitera, a ordem que apresenta maiores dificuldades de se encaixar na filogenia dos insetos, já que possui várias características primitivas, associadas a diversas autapomorfias, o que dificulta saber a qual táxon seria mais relacionada. Apesar de sua grande diversidade, estimada entre 600.000 a 1.200.000 (GRIMALDI & ENGEL 2005), e superestimada por alguns autores em até 2,5 milhões de espécies (STORK 1996), é uma das ordens mais recentes, tendo sua origem há, aproximadamente, 230 milhões de anos, sendo o fóssil mais antigo relacionado aos himenópteros um xilídeo primitivo do Triássico (GRIMALDI & ENGEL 2005).

Esse grande táxon possui algumas características distintivas, das quais uma das mais importantes é o mecanismo de determinação do sexo, já que todos os himenópteros são haplodiplóides, sendo os machos haplóides, formados por partenogênese arrenótoca, ou seja, pela postura de um ovo não fecundado (contendo apenas um conjunto cromossômico da mãe), e as fêmeas diplóides, originadas a partir de ovos fecundados (GULLAN & CRASTON 2005) (FIGURA 1). A partir desse mecanismo de determinação sexual, é possível para as fêmeas dos himenópteros o controle da razão sexual de sua prole, tornando esse aspecto importante de ser estudado, principalmente quando se estuda a biologia de nidificação. Por conta deste mecanismo de determinação do sexo ser, em algumas espécies, o resultado da ação de um único gene, o gene *csd*, que determina a formação em heterozigose de fêmeas e em hemizigose de machos, é relatada a existência de machos diplóides (“fêmeas” homozigotas) em diversas espécies (WILGENBURG *et al.* 2006). A forma que esse sistema de determinação genética funciona nos himenópteros ainda não é totalmente esclarecida e nem como ocorre a complementação dos alelos do gene em questão (BEYE 2004).

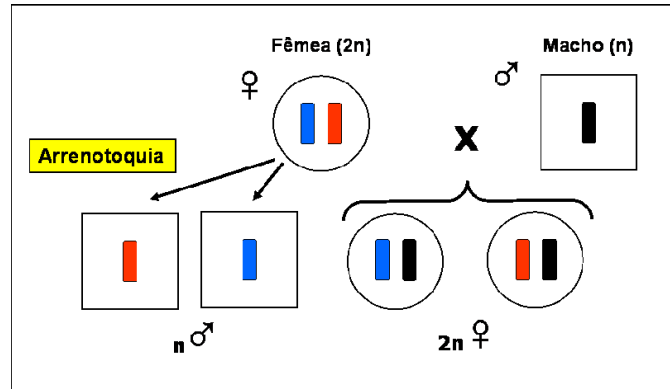


FIGURA 1. Esquema da partenogênese arrenótoca com a ploidia de machos e fêmeas.

A diferença nos níveis de fertilidade e de sociabilidade em grupos de himenópteros também é uma característica marcante dessa ordem, já que ocorrem desde espécies solitárias até espécies eussociais, como as formigas e algumas espécies de abelhas e vespas, que apresentam divisão de trabalho e sobreposição de gerações. Nos diferentes níveis de organização social é possível ver diferenças também na fertilidade das fêmeas e, nos casos de eussocialidade, as rainhas são superférteis e responsáveis pela reprodução de toda a colônia (GULLAN E CRASTON 2005).

### 1.1 Sistemática de Hymenoptera e a Tribo Centridini

Este táxon é composto por duas subordens, Symphyta e Apocrita, que apresentam uma diversidade de espécies maior do que as abelhas, formigas e vespas que geralmente são os Himenoptera conhecidos pelos leigos.

A subordem Apocrita é disposta em: Parasitica e Aculeata, sendo Parasitica formado por espécies parasitóides, enquanto Aculeata agrupa todas as espécies capazes de ferroar (GAULD & BOLTON 1996). A hipótese mais aceita atualmente sobre a filogenia de Aculeata foi proposta por Brothers (1999) a partir de caracteres morfológicos (Figura 2).

O grupo Aculeata é formado pelas superfamílias Chrysidoidea, Vespoidea e Apoidea, sendo a superfamília Apoidea caracterizada pela constrição abdominal (cintura) e ausência de pernas na fase larval. Esta superfamília é um grupo

monofilético formado pelos Apiformes e Esfeciformes (MELO 2000). O clado dos Apiformes corresponde ao grupo monofilético das abelhas, uma grande família que possui cerca de 30.000 representantes que fornecem pólen e néctar à progênie (GAULD & BOLTON 1996).

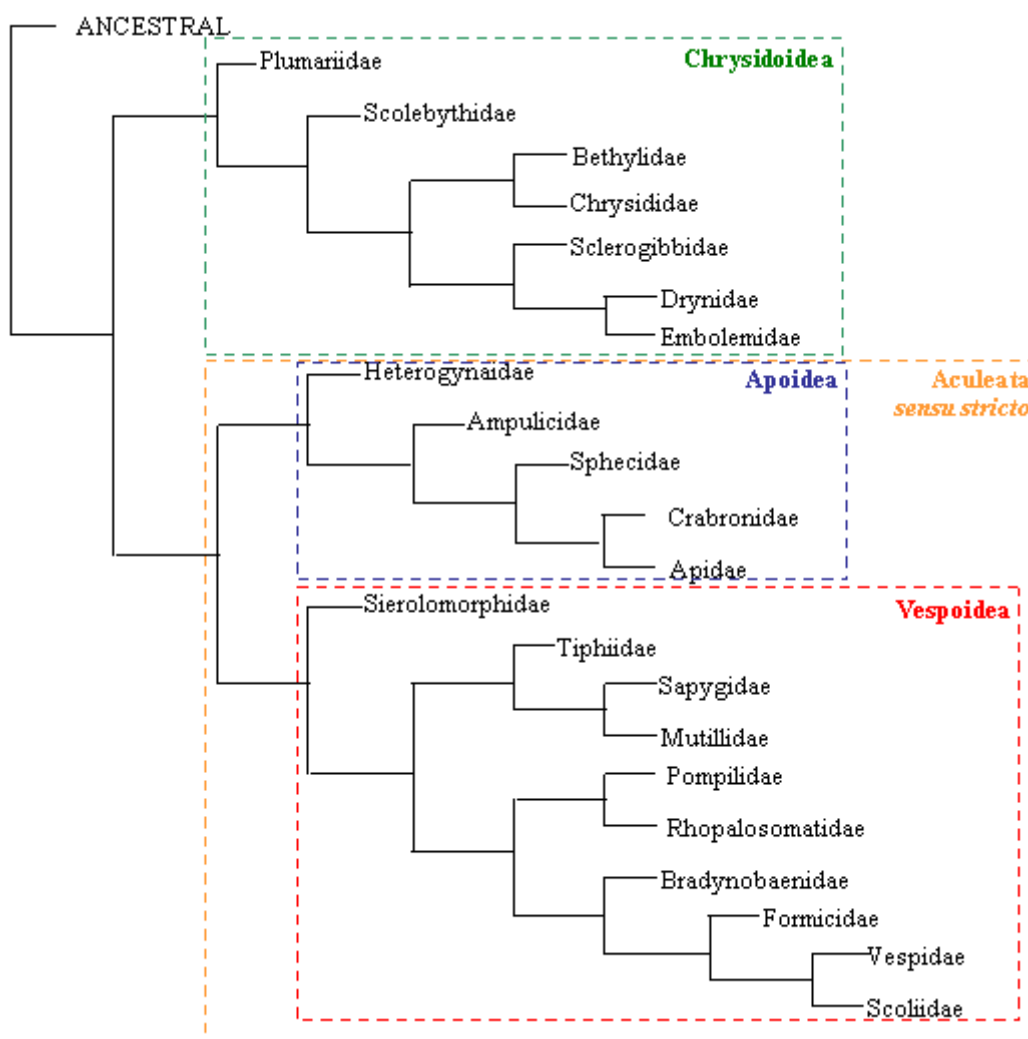


FIGURA 2. Filogenia das famílias de Aculeata (BROTHERS 1999), obtida a partir de caracteres morfológicos.

É no interior deste clado que está inclusa a tribo Centridini, um grupo monofilético próximo aos corbiculados, sendo comumente usado como grupo irmão do mesmo, como visto na Figura 3, retirada de Cameron & Mardulyn (2001). A tribo é constituída de, aproximadamente, 167 espécies de abelhas agrupadas nos gêneros

*Centris* e *Epicharis* (MICHENER 2000, SILVEIRA *et al.* 2002). São abelhas solitárias cujas fêmeas são especializadas na coleta de óleos florais. O gênero *Centris* Fabricius 1804 agrupa 69 espécies (SILVEIRA *et al.* 2002) em 12 subgêneros de distribuição Neotropical, da Argentina e Bolívia ao sul dos Estados Unidos. São observadas em vários domínios fitogeográficos do Brasil, como a caatinga (AGUIAR & GARÓFALO 2004), cerrado (GARÓFALO 2000), floresta estacional semi-decídua (AGUIAR & GARÓFALO 2004), incluindo ainda registros na Amazônia central (MORATO *et al.* 1999).

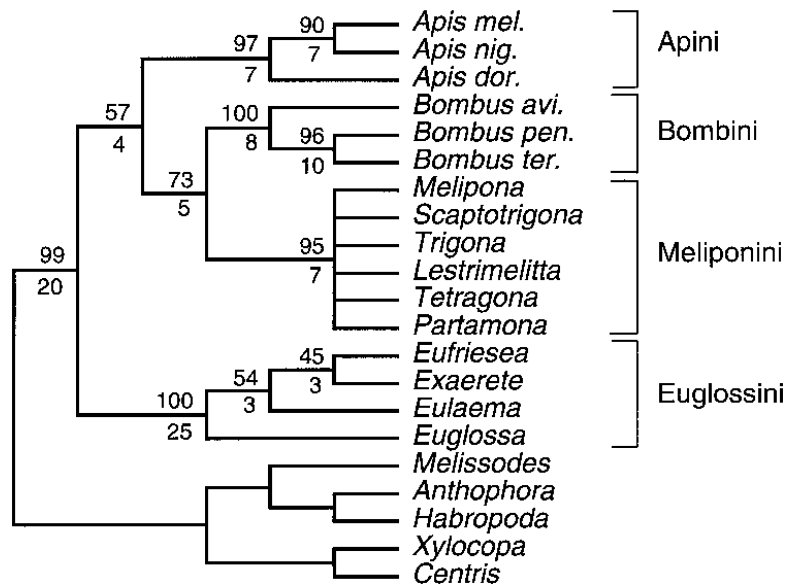


FIGURA 3. Árvore dos corbiculados baseada em caracteres genéticos e morfológicos, mostrando a relação de *Centris* com o grupo (CAMERON & MARDULYN 2001)

As abelhas do gênero *Centris* apresentam diversas características morfológicas que as tornam insetos especializados em polinização (FIGURA 4). Entre tais caracteres, destaca-se o longo comprimento da glossa que as fazem capazes de alcançar o pólen e o néctar de plantas que possuem flores com tubo floral longo - Apocynaceae, Bignoniaceae, Boraginaceae, Convolvulaceae, Orchidaceae, Pontederiaceae, Rubiaceae e Solanaceae (SCHLINDWEIN 2000). O tamanho corporal, médio ou grande, apresentado por algumas espécies, permite que tais insetos voem

longas distâncias, favorecendo os organismos vegetais que apresentam floração em massa, impedindo a ocorrência de geitonogamia e autogamia (SCHLINDWEIN 2000).

Além das características morfológicas, essas abelhas apresentam comportamentos que favorecem a polinização, como a coleta de pólen por vibração (BUCHMANN 1983), característica rara entre as espécies de abelhas, que permite o acesso ao pólen em anteras poricidas (SCHLINDWEIN 2000). Devemos considerar também que estas abelhas são poliléticas, pois coletam pólen de várias espécies vegetais (SCHLINDWEIN 2000). O estudo de Aguiar *et al.* (2003) relata mais de 24 famílias de plantas visitadas por espécies de *Centris*.



FIGURA 4. Espécime de *Centris* sp em flor de Malpighiaceae

Entretanto, a característica mais singular desse táxon é relacionada à coleta de óleos florais pelas fêmeas, uma característica primeiramente verificada por Steafen Vogel, na década de 60. Estes óleos são utilizados por tais abelhas para impermeabilizar seus ninhos ou alimentar suas larvas (SCHLINDWEIN 2000). A coleta é realizada e os óleos transportados em pentes especiais, as escopas, localizados nas pernas das fêmeas, tornando estas abelhas as responsáveis pela polinização de plantas oleíferas, como as Malpighiaceae (FREITAS *et al.* 1999) e Scrophulridae (VOGEL & MACHADO 1991), além de mais seis famílias de plantas que produzem óleo floral - Cucurbitaceae, Iridaceae, Krameriaceae, Orchidaceae,



Primulaceae e Solanaceae (STEINER & WHITEHEAD 1988). Este óleo é disponibilizado nos elaióforos (FIGURA 5).

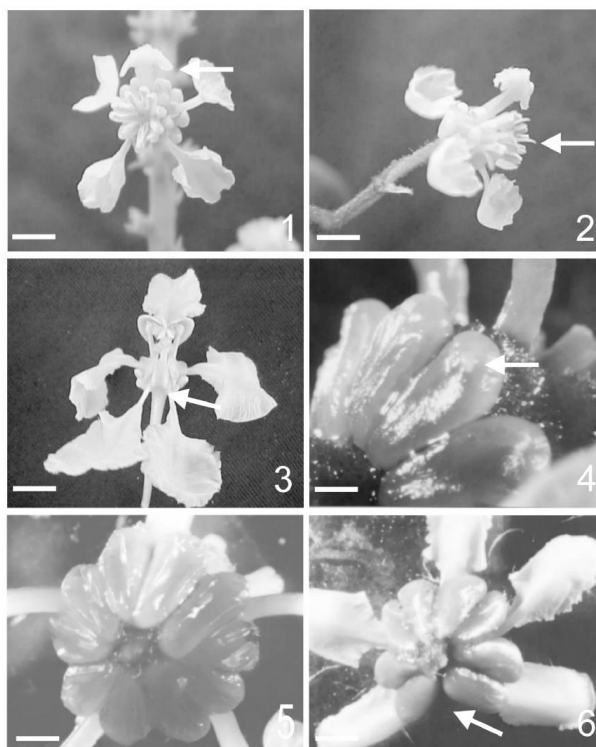


FIGURA 5. Elaióforos de Malpighiaceae (COSTA *et al.* 2006)

Outra característica marcante do gênero *Centris* é a variedade das formas de nidificação. A maioria das espécies constrói seus ninhos no solo (COVILLE *et al.* 1983). No entanto, alguns subgêneros - *Hemisiella* Moure 1945, *Heterocentris* Cockerell 1899 e *Xanthemisia* Moure 1945 - constroem seus ninhos em cavidades preexistentes (COVILLE *et al.* 1983), incluindo ninhos-armadilha (FRANKIE *et al.* 1988, CAMILLO *et al.* 1995, JESUS & GARÓFALO 2000, GARÓFALO 2000, VIANA *et al.* 2001, AGUIAR & MARTINS 2003, AGUIAR & GARÓFALO 2004), tornando tais armadilhas formas eficientes de captura dessas abelhas. Na bibliografia disponível, foram encontradas diversas espécies de *Centris* que nidificaram em ninhos armadilha, sendo a maioria de *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith (SILVA *et al.* 2001, MADEIRA-SILVA & MARTINS 2006). As comunidades de abelhas têm sido estudadas por vários métodos, principalmente pela coleta nas flores com redes entomológicas (SILVEIRA *et al.* 2002). Entre os métodos alternativos, inclui-se o de ninhos armadilha (= NA) que consiste na oferta de cavidades artificiais. Abelhas que utilizam cavidades preexistentes, ou seja, que não escavam o substrato para construir o ninho ocupam

estas cavidades para nidificar. Devido à eficácia deste método de amostragem, os NA revelaram-se muito úteis para inventariar e comparar a diversidade de abelhas solitárias em determinadas áreas (CAMILLO *et al.* 1995, VIANA *et al.* 2001, AGUIAR & MARTINS 2002), para obtenção de dados biológicos sobre espécies mais abundantes (PEREIRA *et al.* 1999, JESUS & GARÓFALO 2000, ALVES-DOS-SANTOS *et al.* 2002, AGUIAR & GARÓFALO 2004) e para avaliar alterações da qualidade ambiental e efeitos da fragmentação (TSCHARNKE *et al.* 1998, MORATO & CAMPOS 2000, STEFFAN-DEWENTER 2002). No Brasil, mais de 50 espécies de abelhas já foram amostradas utilizando este tipo de estratégia, das quais nove espécies de *Centris* (GARÓFALO *et al.* 2004).

As informações sobre a biologia de nidificação de *Centris* são recentes (VIANA *et al.* 2001, SILVA *et al.* 2001, AGUIAR & MARTINS 2002, AGUIAR & GARÓFALO 2004). Os dados indicam a presença de três ou quatro gerações durante o ano, que ocorrem durante a estação chuvosa (AGUIAR & GARÓFALO 2004). Contudo, a estrutura sociogenética dos ninhos das espécies que ocorrem no Brasil é desconhecida. A falta destas informações em grupo tão importante de polinizadores requer esforços na busca de marcadores para o estabelecimento de parâmetros genéticos do grupo. São objeto deste estudo duas espécies de *Centris* que possuem grande representatividade no Brasil, sendo espécies bem amostradas em ninhos-armadilha, *Centris (Hemisiella) tarsata* e *Centris (Heterocentris) analis*.

## 1.2. Importância das abelhas

Há indícios de que o surgimento das abelhas tenha ocorrido pouco depois do aparecimento das fanerógamas há 140 - 135 milhões de anos (CRANE *et al.* 1995), sendo o fóssil mais antigo de abelha (*Melittosphex burmensis*) datado do início do Cretáceo (POINAR & DANFORTH 2006). Especula-se que o crescimento da oferta de néctar e pólen tenha sido o principal fator que permitiu a mudança nas abelhas do hábito predatório, presente nos ancestrais e ainda hoje nas vespas, para o de coleta de produtos florais. Cerca de 85% das 250.000 espécies descritas de Angiospermas depende de polinizadores (GRIMALD & ENGEL 2005) e, segundo Klein (2007), 35% das culturas de alimentos do mundo necessitam de animais como mediadores da polinização.

As abelhas compõem o grupo mais importante de polinizadores, uma vez que suas espécies, exceto as cleptoparasitas, são visitantes obrigatórios das flores (ROUBIK 1989). Nos Estados Unidos, o serviço ambiental de *Apis mellifera* como polinizador está estimado entre 5 a 6 bilhões de dólares (GULLAN & CRASTON 2005). Por esta razão, as abelhas são consideradas espécies-chave de ecossistemas tropicais e agroecossistemas (KLEIN *et al.* 2003).

Este importante papel na polinização faz de espécies, como aquelas de Centridini, organismos-chave na manutenção de ecossistemas tropicais (SCHLINDWEIN 2000). As espécies nativas apresentam um potencial de polinização maior do que espécies introduzidas, já que um local com grande riqueza e diversidade de espécies apresenta uma maior efetividade da sua polinização; portanto, o nicho ocupado por diversas abelhas não pode ser substituído por uma espécie ou mesmo por algumas delas (HOEHN *et al.* 2008). Contudo, não é só na polinização de ambientes naturais que essas abelhas apresentam bom desempenho. Diversos estudos foram realizados utilizando esses insetos na polinização de plantas de interesse comercial, como a acerola, caju e tomate (FREITAS *et al.* 1999, OLIVEIRA & SCHLINDWEIN 2003), visando o estabelecimento de uma agricultura mais rentável e sustentável.

Apesar de sua inegável importância, uma das maiores dificuldades para a manutenção e conservação das abelhas é o desconhecimento de sua biologia, principalmente das espécies solitárias, ainda que estas correspondam a 85% da fauna de abelhas nativas brasileiras. Por esta razão, estudos sobre a interação destes insetos com o meio ambiente são requeridos para se conhecer os meios de conservá-los (ELLIS *et al.* 2006).

Nas últimas décadas tem sido descrita uma diminuição das populações de abelhas como resultado da ruptura dos sistemas de polinização resultante de atividades humanas, como a fragmentação de habitats e uso de defensivos agrícolas. No entanto, não há total concordância a respeito desta redução (CANE 2001, ROUBIK 2001).

Importa ainda investigar como estas espécies se comportam em ambientes urbanos, já que com a fragmentação dos ambientes florestais, as cidades têm se tornado refúgio de várias espécies animais que têm expandido e, muitas vezes,

transferido seu habitat para as cidades. Diversos grupos taxonômicos fazem do ambiente urbano seu habitat – estudos realizados retratam a utilização desses ambientes por artrópodes e morcegos, entre outros (KURTA & TERAMINO 1992, GILLESPIE & RODERICK 2002). As pesquisas realizadas em ecossistemas urbanos podem prover dados ecológicos sobre os bons e maus aspectos da urbanização, ajudando a diminuir os danos às espécies que vivem nas cidades e até mesmo ao homem (NIEMELLÄ 1999). O conhecimento da biologia das abelhas de ambientes alterados é de extrema importância, principalmente para abelhas nativas, pouco conhecidas, como é o caso de abelhas da tribo Centridini, alvo do presente estudo.

## 2. Objetivo e Justificativa

Neste trabalho, como parte do Projeto BIOTA FAPESP (Processo 04/15801-0), estudamos aspectos da biologia das populações principalmente relacionados à nidificação e à estrutura genética das populações presentes em ambientes urbanos. O estudo da genética da conservação já ocorre há algumas décadas (FRANKEL & SOULÉ, 1981), mas maior atenção precisa ser dada à influência do potencial genético sobre o declínio dos polinizadores, sendo que uma das dificuldades para a manutenção e conservação das abelhas é o desconhecimento da biologia da maioria das espécies. Portanto, este trabalho tem como objetivo elucidar as seguintes questões:

- i) Qual a estrutura sociogenética intranidal das espécies de *Centris* (Heterocentris)  *analis* e *Centris* (Hemisiella) *tarsata*?
- ii) Como é a biologia de nidificação das espécies *Centris* (Heterocentris)  *analis* e *Centris* (Hemisiella) *tarsata*?
- iii) Como ocorre a colonização de uma área por *Centris* (Heterocentris)  *analis* e *Centris* (Hemisiella) *tarsata*?

Dados sobre espécies de abelhas solitárias tão pouco conhecidas em sua biologia e genética poderão ser relevantes para a definição de planos de manejo e conservação das mesmas em seu ambiente natural, nas cidades e nos ambientes de sistemas agrícolas. Estes dados poderão, no futuro, auxiliar a implementação de uma agricultura mais sustentável e o estabelecimento de sistemas agroecológicos de culturas, bem como subsidiarem a elaboração do plano gestor da paisagem urbanística dos municípios

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material

*Centris (Heterocentris) analis* - Espécie descrita por Fabricius em 1804, sua distribuição vai desde o México até o Brasil (FIGURA 6). Como outras espécies do mesmo subgênero, essa espécie nidifica em cavidades preexistentes, podendo nidificar em ninhos abandonados de *Sceliphron* e de *Melitoma* e em ninhos-armadilha, como já anteriormente referido.

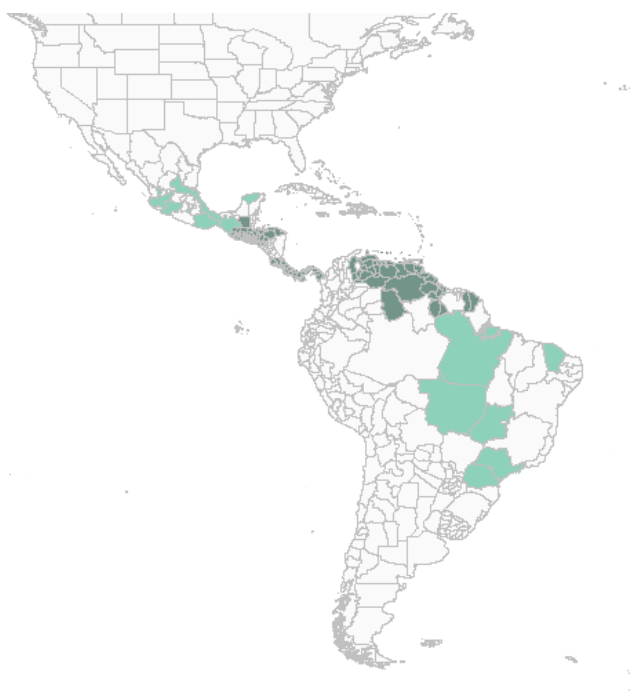


FIGURA 6. Em azul claro, áreas de ocorrência de *Centris analis*, segundo o catálogo de abelhas Moure.

*Centris (Hemisiella) tarsata* - *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith, 1874 apresenta registros somente em território brasileiro que indicam sua ocorrência nos estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás. As

referências contidas no catálogo Moure (FIGURA 7) não incluem todas as localidades descritas na literatura para a ocorrência da espécie. Como ocorre com o subgênero *Heterocentris*, o subgênero *Hemisiella* também é caracterizado por suas espécies nidificarem em cavidades pré-existentes, podendo também ser coletadas através de ninhos-armadilha.



FIGURA 7. Em azul claro, áreas de ocorrência de *Centris tarsata*, segundo o catálogo de abelhas Moure.

### 3.2. Áreas de estudo

A amostragem para biologia de nidificação foi realizada em quatro municípios do Estado de São Paulo: Araras (campus da Universidade Federal de São Carlos) (FIGURA 8), Rifaina (Fazenda Rio Branco) (FIGURA 9), São Carlos (campus da Universidade Federal de São Carlos) (FIGURA 10) e (Fazenda Canchim da EMBRAPA Pecuária Sudeste) e Ribeirão Preto (campus da Universidade de São Paulo) (FIGURA 11).

Essas localidades, de acordo com o Sistema Internacional de Köppen apresentam a classificação climática de acordo com a tabela abaixo (TABELA 1):

TABELA 1- Características climáticas das cidades em que foram realizadas coletas de ninhos de *Centris analis* e *Centris tarsata* estabelecidos em ninhos-armadilha.

<b>Cidade</b>	<b>Tipo climático</b>	<b>Altitude Média</b>	<b>Temperatura Média</b>	<b>Pluviosidade Média</b>	<b>Localização geográfica</b>
Araras	Cwa	620m	21.6°C	1384.5mm	22°18'S, 47°22'W
Ribeirão Preto	Aw	531m	23.2°C	1422.5mm	21°12'S, 47°48'W
Rifaina	Aw	575m	23.2°C	1531.6mm	20°00'S, 47°27'W
São Carlos		830m	21.2°C	1422.8mm	22°01'S, 47°53'W

Aw: tropical, com uma estação, quente e chuvosa, estendendo-se de setembro a abril; e uma estação fria e seca, estendendo-se de maio a agosto.

Cwa: subtropical úmido, com uma estação fria e seca e uma quente e chuvosa

Em todas as localidades, as vegetações são heterogêneas e há forte ação antrópica, com a presença de culturas e espécies exóticas.





FIGURA 8. Sítios de coleta de ninhos de *Centris analis* e *Centris tarsata* no campus UFSCar de Araras, em Araras.



FIGURA 9. Sítios de coleta de ninhos de *Centris analis* e *Centris tarsata* na Fazenda Rio Branco, em Rifaina.



FIGURA 10. Sítios de coleta de ninhos de *Centris analis* e *Centris tarsata* no campus UFSCar de São Carlos, em São Carlos.



FIGURA 11. Sítio de coleta de ninhos de *Centris analis* na FFCLRP, em Ribeirão Preto

Essas áreas foram escolhidas após observação de nidificações de *Centris* em ninhos-armadilha dispostos para coleta de vespas do gênero *Trypoxylon*, um dos projetos em desenvolvimento no Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros,

ou graças ao conhecimento prévio de atividade de nidificação por fêmeas de *Centris* na área, como ocorreu em Ribeirão Preto. Amostras de ninhos de outras localidades, coletadas por pesquisadores colaboradores, foram requisitadas e fazem parte do acervo de amostras de ninhos de *Centris tarsata* e *Centris analis* que dispomos para análises genéticas (TABELA 2).

TABELA 2- Localidades e número de amostras de *Centris analis* e *Centris tarsata* de outras regiões do Brasil.

<b>Localidade</b>	<b>Colaborador</b>	<b><i>C.tarsata</i></b>	<b><i>C.analis</i></b>
João Pessoa, PB	Dr. Celso Martins Feitosa	8	23
Londrina, PR	Dra. Sílvia H. Sofia	4	0
Telem Borda, PR	Dra. Sílvia H. Sofia	3	0
Salvador, BA	Dra. Cândida Aguiar	0	5
Ibiraba, BA	Dra. Cândida Aguiar	9	0
Uberlândia, MG	Dra. Solange Augusto	4	4
São Sebastião, SP	Dra. Isabel A. dos Santos	4	0
Campos dos Goytacazes, RJ	Dra. Maria C. Gaglianone	5	5

### 3.3. Estratégia de amostragem para Biologia de Nidificação

Dadas as vantagens da utilização de ninhos-armadilha, os ninhos foram coletados por meio de ninhos armadilha confeccionados com papel colorset preto em dois tamanhos - tubo grande (10.5 x 0.8 cm) e tubo pequeno (6.0 x 0,6 cm). Os tubos foram confeccionados com técnica semelhante à descrita por Camillo (1995). Os cilindros são fechados com fita adesiva e têm uma das extremidades fechada com um pedaço de “colorset”. Como ninhos armadilha foram utilizados também gomos de bambu, com comprimentos e diâmetros variados. Os ninhos de bambu foram

agrupados com barbante, enquanto os de colorset foram colocados em suportes retangulares de madeira de 30 x 11 x 4,5 cm, com 55 orifícios cada (FIGURA 12).



FIGURA 12. Ninhos-armadilha de “colorset” em bloco de madeira e em bambus

A checagem dos ninhos armadilha foi realizada uma vez por mês nos locais mais distantes e diariamente no campus da USP - Ribeirão Preto. Os tubos ocupados foram retirados e substituídos por novos. Os ninhos de “colorset” fundados foram levados ao laboratório e tiveram sua abertura disposta no interior de tubo de ensaio, para evitar o escape dos adultos ao emergirem, enquanto os gomos de bambu tiveram a abertura obstruída por uma tela plástica presa com elástico (FIGURA 13).



FIGURA 13. Formas de armazenamento no laboratório de ninhos-armadilha de “colorset” e bambu

Após a emergência dos adultos, eles foram pesados em balança de precisão (0,1 mg) para estimar alocação sexual e sexados para determinação da razão sexual.

Após a emergência de todos os indivíduos de um ninho, os ninhos de bambu tiveram seu diâmetro e comprimento determinados, pois esses apresentavam diferenças de medidas. O número de células que compunha tanto os ninhos construídos em bambu, quanto os ninhos em “colorset” foi mensurado. A emergência de parasitóides (cleptoparasitas) e a não emergência foram computadas. Depois de realizadas as mensurações, os adultos foram estocados a -20°C para as análises genéticas. Os ninhos de *C. analis* que foram construídos em Ribeirão Preto foram observados diariamente e, além de quantificar os ninhos que eram terminados, quantificamos também o número de fêmeas e machos que dormiam nos ninhos-armadilha desocupados. O tempo que as fêmeas levavam para aprovisionar os ninhos também foi registrado. Contudo, não estocamos todos os indivíduos para as análises genéticas, para não prejudicar a população que nidifica nesta área há alguns anos.

### **3.4. Análise genética**

Como marcadores genéticos, foram utilizados variantes eletroforéticas de proteínas (alozimas), seqüências de genes mitocondriais (citocromo b e COI) e locos microsatélites, que ainda necessitam do desenvolvimento de primers específicos para *C. analis* e *C. tarsata*.

#### **3.4.1. Alozimas**

A técnica utilizada foi a eletroforese no sentido horizontal em gel de amido de milho (Penetrose 30™, Corn Brazil) a 14%, preparados em diferentes sistemas de tampão. Os padrões de diferentes enzimas foram estabelecidos (TABELA 2). Extratos de tórax/cabeça de cada indivíduo foram preparados em tubos Eppendorf contendo 150 µl de 2-mercaptoetanol 0.2% v/v como solução homogeneizadora, com auxílio de bastão de vidro. Posteriormente, este material foi centrifugado a 4.000 g, por 15 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram absorvidos em papel Whatman n° 3 (5x7mm) e aplicados no gel.

TABELA 3 - Sistemas enzimáticos analisados eletroforeticamente em amostras de *Centris ssp.* (machos e fêmeas adultos) para detecção de polimorfismos genéticos.

Enzima (Enzyme Commission Number)	Abreviações		
	Enzima	Loco	Tampão <sup>†</sup>
Aconitase (4.2.1.3)	AC	<i>Ac-1, Ac-2</i>	TC
Adenilato quinase (2.7.1.20)	AK	<i>Ak</i>	TC8
Aldolase (4.1.2.13)	ALD	<i>Ald-2, Ald-2</i>	TC
Esterase (3.1.1.1)	EST	<i>Est-1 – Est-4</i>	TC
Fosfatase ácida (3.1.3.2)	ACP	<i>Acp</i>	TC
Fumarase (4.2.1.2)	FUM	<i>Fum</i>	TC
Glucose-6-fosfato desidrogenase (1.1.1.49)	G6PDH	<i>G6pdh</i>	TC-NADP
Glucose fosfato isomerase (5.3.1.9)	GPI	<i>Gpi</i>	TC8
Isocitrato desidrogenase (1.1.1.42)	IDH	<i>ldh</i>	TC-NADP
Transaminase glutâmica oxaloacética (2.6.1.1)	GOT	<i>Got</i>	TC
α-Glicerofosfato desidrogenase (1.1.1.8)	GPDH	<i>Gpdh-1 Gpdh-2</i>	TC8
Hexoquinase (2.7.1.1)	HK	<i>Hk-1, Hk-2</i>	TC
β-Hidroxiacetato desidrogenase (1.1.1.30)	HBDH	<i>Hbdh</i>	TC8
Leucil-aminopeptidase (3.4.11.1)	LAP	<i>Lap</i>	TCB
Malato desidrogenase (1.1.1.37)	MDH	<i>Mdhc, Mdhm</i>	TC8
Enzima malica (1.1.1.40)	ME	<i>Me</i>	TC8
Fosfoglicomutase (2.7.5.1)	PGM	<i>Pgm-1</i>	TC
Peptidases A, B e D (3.4.*) <sup>‡</sup>	PEP A, B, D	<i>Pep-A, Pep-D</i>	TCB
6-fosfogluconato desidrogenase (1.1.1.46)	6-PGD	<i>6Pgd</i>	TC-NADP
Superóxido dismutase (1.15.11)	SOD	<i>Sod</i>	TCB

<sup>†</sup>TC = Tris - ácido cítrico pH 7.5; TC8 = Tris – ácido cítrico pH 8.0; TCB = Tris – ácido cítrico pH 8.0 + ácido bórico, pH 8.3.

TC-NADP= Tris - ácido cítrico pH 7,5 + NADP. Tampões e misturas de reação foram preparadas de acordo com protocolos descritos em Harris & Hopkinson (1976).

<sup>‡</sup> Peptidase: A = leucil-alanina; B = leucil-glicil-glicina; D = leucil-prolina

### 3.4.2. DNA mitocondrial

O DNA genômico total foi extraído das pernas após maceração em microtubos de 1,5 mL. A extração seguiu o protocolo padrão de extração fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al.* 1989). Algumas extrações foram realizadas utilizando CTAB em substituição ao SDS como detergente.

Parte do gene mitocondrial citocromo B (cyt B) foi amplificada por PCR em 35 ciclos de amplificação (94°C por 30 seg; 54°C por 15 seg; 72°C por 1 min). Cada reação foi preparada com 2,5µL de dNTPs 100 mM, 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2,5 µL de tampão Biotools10x, 0.5 µM de cada oligo (R e F) a 12,5 µM, 1 µL de Taq DNA polimerase (Biotools, 1 U/µL), 1 µL de DNA extraído e água para completar 25 µL. A amplificação desta região genômica foi possível com a utilização de um par de oligos iniciadores igualmente utilizado para estudo da região homóloga de *Centris inermis* (CAMERON & MARDULYN 2001), com o uso do primer CB-N-11367 5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3' (SIMON *et al.* 1994).

Parte do gene COI (subunidade I da citocromo oxidase) foi amplificada por PCR em 40 ciclos de amplificação (4 ciclos: 95 °C por 30 seg; 48 °C por 30seg; 72 °C por 45s e 35 ciclos: 95 °C por 30 s; 52 °C por 30s ; 72 °C por 45s e um último estágio de 72 °C por 5 minutos). Cada reação foi realizada em volume final de 25µL contendo 2,5µL de dNTPs 100 mM, 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2,5 µL de tampão Biotools10x, 0.5 µM de cada oligo (R e F) a 12,5 µM, 1 µL de Taq DNA polimerase(Biotools, 1 U/µL), 1 µL de DNA extraído. A amplificação desta região genômica foi possível com a utilização do seguinte par de oligos iniciadores: primer reverse de *Eulaema nigrita* 5'GATATTAATCCTAAAAAATGTTGAGG 3'; primer foward de *Apis melífera* 5' GGAGATCCAATTCTTTATCAAC 3'. Para a confirmação do sucesso da etapa de PCR, os fragmentos foram visualizados em géis de poliacrilamida 8% corados com prata ou de agarose 1% corado com Gel Red™ e visualizado em luz UV.

Os produtos de amplificação destas regiões foram purificados usando 1U de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, GE) e 10U de *ExoI* (Exonuclease I, GE) para 8µL de DNA. A reação de seqüenciamento foi realizada em volume final contendo 3,5µL de Save Money Buffer 2,5x, 0,5µL de Big Dye (Applied Biosystems), 1µM de *Primer* e

1µl de DNA. O sequenciamento direto das cadeias *forward* e *reverse* foram realizados em seqüenciador automático ABI 3700.

### 3.4.3. Análise de seqüências

As seqüências nucleotídicas dos haplótipos para a região *cyt b* e *COI* foram editadas usando o software CodonCode Aligner v 1.5.2 (CodonCode, Dedham, Massachusetts, United States) e, posteriormente, alinhadas usando o editor de seqüências CLUSTAL X (THOMSON *et al.* 1997).

### 3.4.4. RFLP-PCR do DNA mitocondrial

A digestão dos produtos de amplificação foi feita em tampão One-for-All (GE Healthcare) e 1U da enzima de restrição *DraI*. Os padrões de restrição foram visualizados em géis de poliacrilamida 12% corados com nitrato de prata. A escolha das enzimas utilizadas na digestão foi feita através da análise da seqüência do *cyt b* de *Centris inermis* (Cameron & Mardulyn 2001), obtida com o uso do primer CB-N-11367 5'-ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT-3' (Simon *et al.* 1994).

### 3.4.5. Microssatélites

Os microssatélites constituem seqüências de 2-6 pares de base repetidos em tandem; têm como característica um alto grau de polimorfismo, apresentam-se distribuídos por todo o genoma e seus 'alelos' têm ação codominante (ESTOUP *et al.* 1993). O uso de marcadores moleculares com maior grau de polimorfismo, não codificantes, representa uma ferramenta mais poderosa para os estudos familiares e de populações, razão pela qual este tipo de marcador foi tentativamente utilizado.



Até o momento, não foram descritos oligos iniciadores espécie específicos para análise de locos microssatélites no gênero *Centris* (Fabricius 1804). Portanto, tentativas foram realizadas para a análise deste tipo de marcador utilizando primers heterólogos de *Melipona bicolor bicolor* (PETERS *et al.* 1998), *Scaptotrigona postica* (PAXTON *et al.* 1999), *Trigona carbonaria* (GREEN *et al.* 2001), *Apis mellifera* (SOLIGNAC *et al.* 2004), *Euglossa cordata* (SOUZA *et al.* 2007) e *Trypoxylon albitarse* (ALMEIDA *et al.*).

Os testes de heterologia com os primers de *T.albitarse* Talb 02, Talb 03, Talb 05 e Talb 07 nas realizados na seguinte mistura de reação: 7,2 µl de H<sub>2</sub>O, 1,0 µl de Buffer, 0,4µl de DNTP's, 0,4 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µl de primer e 0,2 µl de Taq polimerase (Biotools).

### **3.5. Análise de Dados**

#### **3.5.1 Análise dos dados genéticos**

Com os resultados das análises alozímicas, de microssatélites e dos haplótipos do DNA mitocondrial, estimativas do grau de polimorfismo e o número de alelos por loco puderam ser efetuados. A ocorrência de equilíbrio genético para cada loco e população foi averiguada por meio de um qui-quadrado, comparando-se as frequências genotípicas observadas e esperadas segundo o modelo de Hardy-Weinberg. Para o cálculo destas estimativas foi usado o programa PopGene 3.2 (Yeh *et al.* 2000). O genótipo dos parentais foi inferido a partir dos fenótipos alozímicos da prole, tendo como hipótese a ocorrência de monoginia/monandria.

### 3.5.2. Análise de dados ecológicos

#### 3.5.2.1. Razão sexual (RS)

A razão sexual estimada foi a razão sexual secundária, ou seja, a razão sexual dos indivíduos que emergiram, e não a razão sexual primária, dos ovos ovipositados. A razão sexual de 1:1 foi averiguada por meio de um teste de qui-quadrado, levando em consideração que esta é a razão esperada segundo Fisher (1930). Possíveis diferenças de tamanho, levando-se em conta a massa dos indivíduos, entre machos e fêmeas coletados, foram comparadas por teste *t*, a fim de analisar juntamente com a RS se houve desvio na alocação e no investimento parental entre machos e fêmeas nas duas espécies de *Centris*.

#### 3.5.2.2. Sazonalidade

A presença das espécies durante as coletas, tanto as realizadas em ninhos-armadilhas, como aquelas realizadas em flores, nos permitiu fazer algumas predições sobre a sazonalidade das espécies *Centris tarsata* e *Centris analis*. Associações entre o número de espécies coletadas e fatores abióticos, como condições climáticas e fotoperíodo, foram realizadas por meio da correlação linear de Pearson (BIANCHIN *et al* 2006 *apud* STEEL *et al* 1997).

#### 3.5.2.3. Desenvolvimento

Os dados dos imagos emergidos foram utilizados para mensurar características do desenvolvimento de *Centris analis*, espécie que foi acompanhada durante um ano consecutivo. A partir desse acompanhamento, foram obtidos dados como o tempo de desenvolvimento médio em cada mês, assim como em cada estação do ano e

correlacionar tais achados com os dados climáticos mediante o coeficiente de correlação de Pearson

## 4. Resultados

### 4.1. Biologia de nidificação

Ninhos de *Centris tarsata* - A coleta de ninhos foi realizada de setembro de 2006 até março de 2009. No campus da UFSCar de Araras, as coletas foram realizadas de setembro de 2006 até março de 2008; no campus da USP de Ribeirão Preto, de fevereiro de 2009 a fevereiro de 2010; na Fazenda Rio Branco (Rifaina) de setembro de 2006 até março de 2008 e na Fazenda Canchim da EMBRAPA Pecuária Sudeste (São Carlos) durante o ano de 2008. Neste período, foram coletados 387 ninhos-armadilha de bambu em Araras, 618 em Rifaina e 12 em São Carlos; em Ribeirão Preto, não foram dispostos ninhos de bambu para a nidificação de *Centris* (Fabricius 1804). Nos ninhos de “colorset” dos dois tamanhos, foram amostradas 138 fundações em Araras e 364 em Rifaina, 374 em Ribeirão Preto e 24 em São Carlos, Foram coletados 2007 ninhos ao todo, destes sendo 48 de *C.tarsata* e 374 de *C.analis*. Entretanto, em vários ninhos não ocorreu emergência de adultos, sendo grande a mortalidade desses indivíduos no laboratório e a emergência de parasitas. Dos ninhos coletados de *C. tarsata* (FIGURA 14), emergiram 77 adultos de um total de 124 células. A mortalidade nesses ninhos foi de 19% e em cinco células foram encontrados parasitóides (4%) de espécies ainda não identificadas. Destes ninhos, 5% dos indivíduos entraram em diapausa durante a estação seca. Os dados de biologia de nidificação se restringem a *C. tarsata* proveniente de Araras, pois foi desta espécie o maior número de nidificações coletadas e de emergências no laboratório (TABELA 4).



FIGURA 14. Ninho de *Centris tarsata* em bambu já aberto, mostrando claramente cada uma das células.

TABELA 4 - Resumo dos dados de emergência, mortalidade e parasitismo em *Centris tarsata* amostrada com ninhos armadilha (n = 32) provenientes de Araras.

<b>Caracteres observados</b>	<b>No. Indivíduos</b>	<b>Porcentagem</b>
Adultos emergidos	77	62.2%
Parasitóides	5	4.0%
Diapausa	6	4,8%
Sem desenvolvimento (somente aprovisionada)	24	19.4%
Pupas mortas	6	4,8%
Adultos não emergidos	6	4.8%
<b>Total de células</b>	<b>124</b>	<b>100%</b>

A nidificação de *C. tarsata* ocorreu de outubro/2006 a janeiro/2007 e os adultos emergiram até fevereiro, observando-se claramente duas gerações neste período. As nidificações só foram observadas novamente no final de setembro, coincidindo com o início da primavera e as primeiras emergências ocorreram ao final de outubro. O tempo de nidificação variou muito entre os ninhos mantidos no laboratório - alguns adultos emergiram 12 dias após a data da coleta, enquanto outros emergiram após 60 dias de permanência no laboratório. Os indivíduos de um mesmo ninho apresentaram diferença na emergência de, no máximo, sete dias, sendo que em 75% dos ninhos que ocorreram emergências, o tempo entre a primeira e a última não foi maior que três dias (FIGURA 15 e 16).

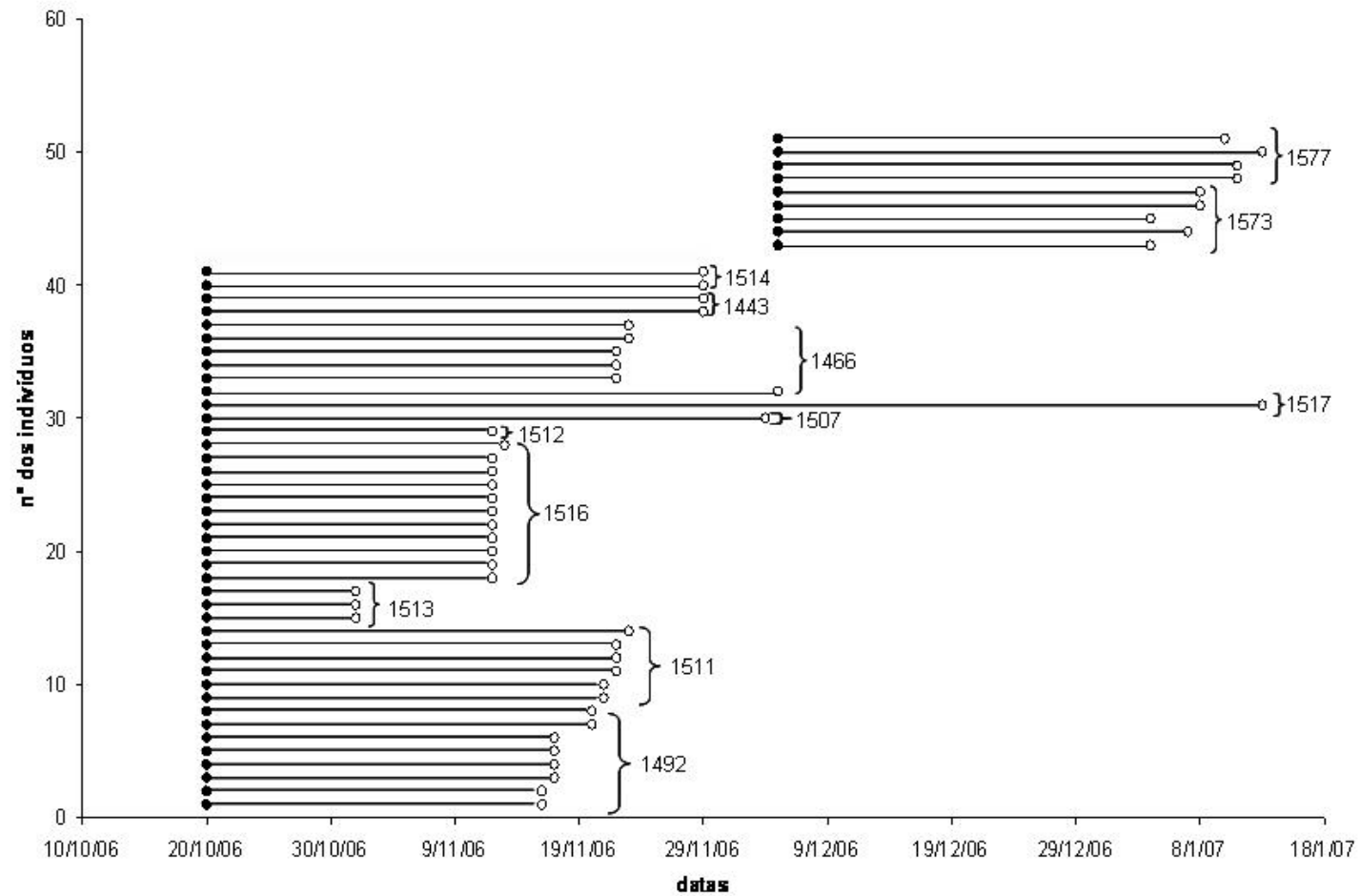


FIGURA 15. Ninhos de *Centris tarsata* estudados no período 2006/2007. Data da coleta (círculo cheio) e emergência (círculo vazio). Indivíduos de um mesmo ninho estão delimitados por colchetes com o número de identificação do ninho.

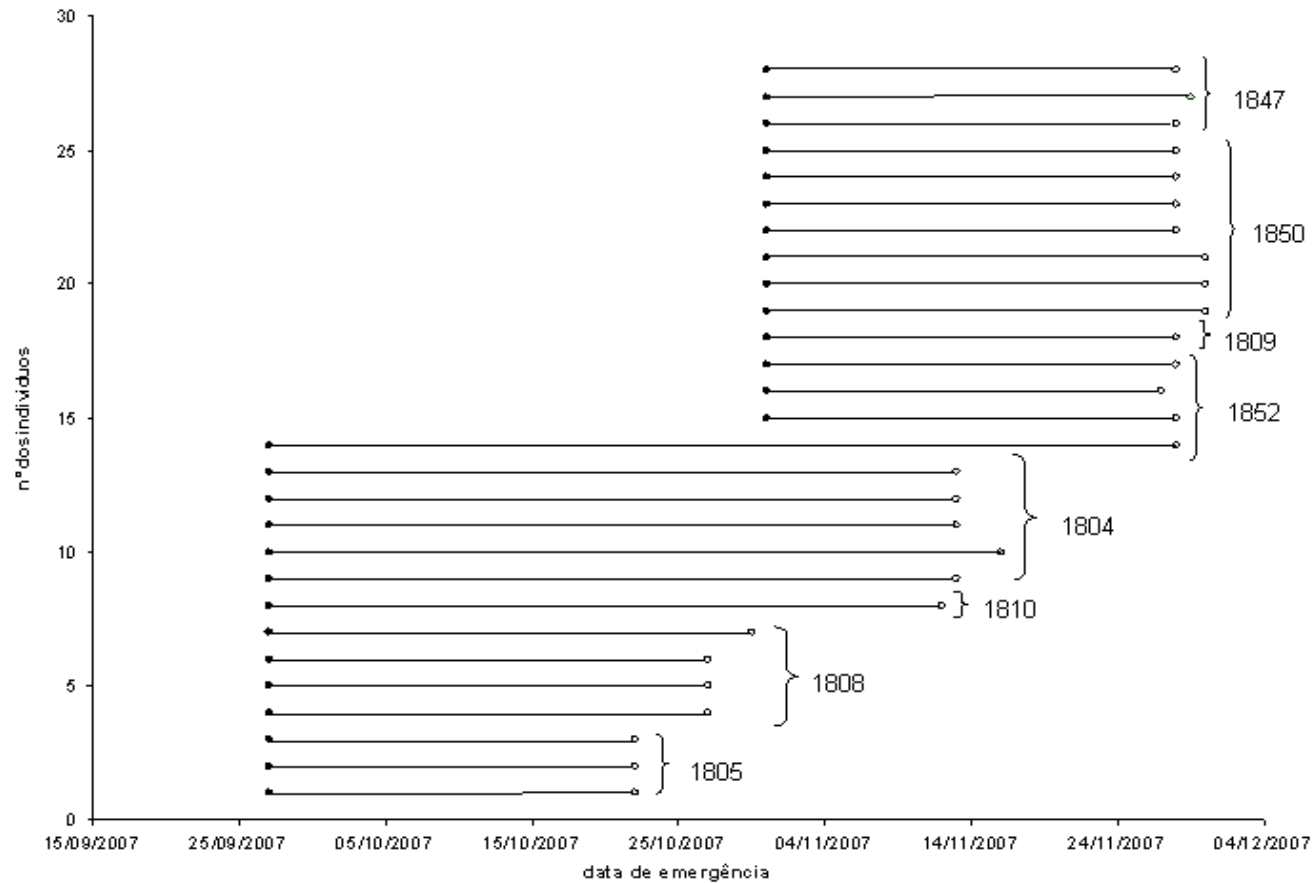


FIGURA 16. Ninhos de *Centris tarsata* estudados no período 2007/2008. Data da coleta (círculo cheio) e de emergência (círculo vazio). Indivíduos de um mesmo ninho estão delimitados por colchetes com o número de identificação do ninho.



A maior porcentagem desses ninhos foi construída em bambu (87,3%), enquanto apenas 12,7% foram construídos em NA de colorset pequenos (0,6 cm de diâmetro); usualmente, os ninhos construídos em colorset foram ocupados por *C. analis*. Os ninhos de bambu apresentaram uma média de 5,4 (2-11) células e 3,9 (1-11) emergências por ninho. Os ninhos considerados para tais estimativas foram somente os que apresentaram, pelo menos, a emergência de um imago; nesses ninhos, as demais células não emergidas foram contabilizadas. O comprimento médio dos ninhos de bambu foi igual a 30,2 cm (19-43) e diâmetro médio igual a 9,2mm (6,1-12,5). As células encontradas no interior dos ninhos estavam dispostas transversalmente, sendo prioritariamente construídas próximas ao final do ninho, no caso de ninhos de bambu.

Os ninhos encontrados em Araras foram coletados no sítio GETAP, que é uma construção do campus onde os bois e bezerros são contidos para vacinação e outros cuidados. Esta construção está situada próxima a áreas de cultivo de cana-de-açúcar e soja e não se encontra próxima a cursos d'água. Em Araras, pudemos observar que em cada sítio ocorre a nidificação preferencial de uma espécie, considerando também as espécies de *Trypoxylon ssp* e de *Podium sp* que nidificam no local, mas novos estudos são necessários para que se possa justificar este mosaico de nidificações.

Ninhos de *Centris analis* - Dos ninhos de *C. analis* (FIGURA 17) que foram coletados em Ribeirão Preto emergiram 627 indivíduos e 45 parasitóides do gênero *Leucospis*, até o começo do mês de fevereiro de 2009. Os ninhos foram todos construídos em NA de colorset do tamanho pequeno e a maioria dos ninhos é proveniente de Ribeirão Preto. Os ninhos de *C. analis* provenientes desta localidade foram acompanhados por 13 meses ininterruptos, de fevereiro/2009 a fevereiro/2010.



FIGURA 17. Ninho de *Centris analis* em tubo colorset com o óleo floral utilizado no fechamento do ninho, aparente

No período referido, foi observado o número de fêmeas que construíam ninhos, de machos que dormiam no sítio de nidificação, de ninhos e quantos dias eles levaram para serem fechados, quanto tempo levou para a emergência dos imagos e todos os dados possíveis de serem extraídos da observação diária dos ninhos (TABELA 5). Algumas fêmeas foram marcadas para inferência de quantos ninhos cada uma constrói e por quanto tempo podemos encontrá-la em um sítio específico. Foram observados também os machos e as fêmeas que dormiam nos tubos vazios (FIGURA 18), mesmo quando as fêmeas não estavam nidificando; contudo, esse comportamento não se manteve constante ao longo do ano.

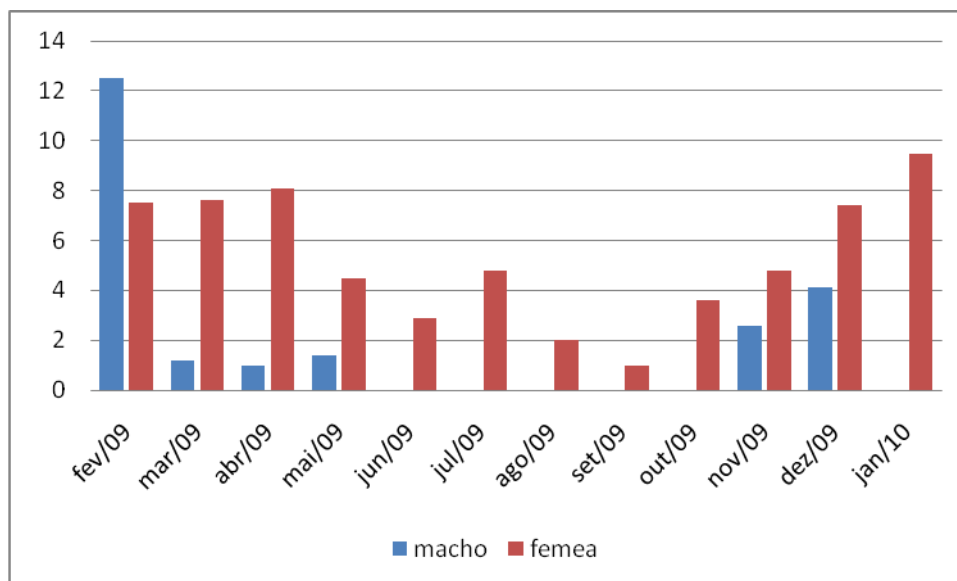


FIGURA 18. Histograma representando a quantidade de machos e fêmeas de *Centris analis* que passaram a noite nos ninhos-armadilha durante ano de 2009

TABELA 5 - Dados de emergência, mortalidade e parasitismo em ninhos de *Centris analis* obtidos em ninhos armadilha provenientes de Ribeirão Preto.

<b>Caracteres observados</b>	<b>No. Indivíduos</b>	<b>Porcentagem</b>
Adultos emergidos	627	57,1%
Parasitóides	45	4,1%
Diapausa	-	
Sem emergência (dados de julho/2009)	427	38,8%
<b>Total de células</b>	<b>1099</b>	<b>100%</b>

A nidificação de *C. analis* ocorreu prioritariamente nos meses de janeiro até abril, sendo março o mês em que ocorreu o maior número de fechamento de ninhos (FIGURA 19). As emergências se concentraram na mesma época do ano, sendo que os meses de fevereiro e março apresentaram maior número de emergências. Contudo, podemos observar que em abril ocorreu o maior número de emergências de fêmeas (TABELA 6). Entretanto, não foram notadas diferenças significativas entre a quantidade de machos e fêmeas e no total de indivíduos emergidos em cada estação do ano (TABELA 7).

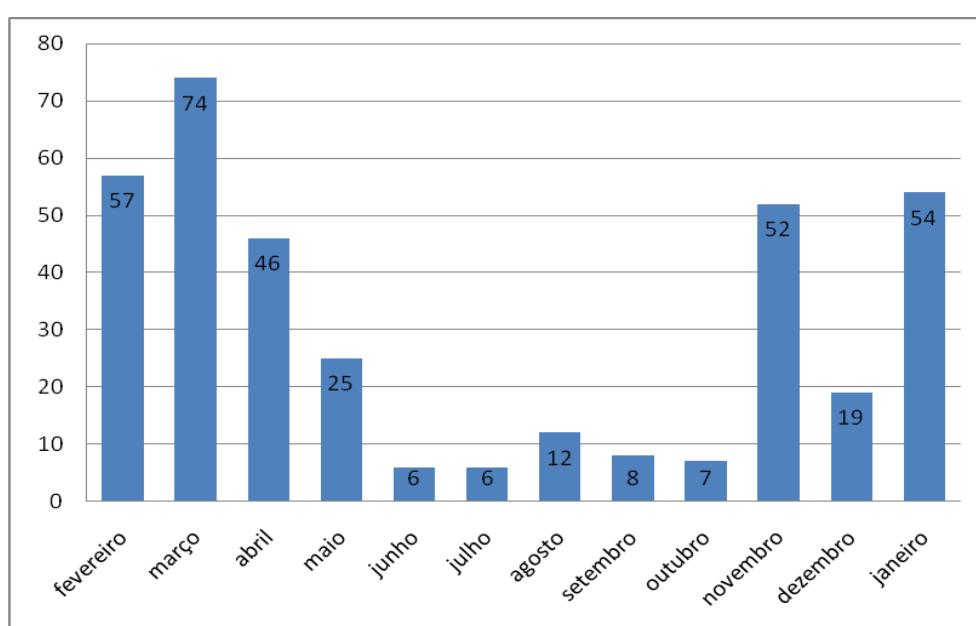


FIGURA 19. Fenologia dos ninhos de *Centris analis* durante 13 meses, de 5/fevereiro de 2009 a 5/fevereiro de 2010

A observação diária também nos possibilitou acompanhar o provisionamento dos ninhos e a inferir que três é o número médio de dias que uma fêmea leva para concluir as células de seu ninho. Assim, pudemos inferir que essas fêmeas levam, em média, um dia para provisionar suas células, já que, ao analisar 282 ninhos que foram abertos após a emergência para retirada de pólen e contagem das células, a média de células por ninho foi de 2,98 células por tubo.

TABELA 6 – Número de indivíduos emergidos dos ninhos de *Centris analis* no período de 2009/2010

<b>Meses</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>Machos</b>	<b>Total</b>
Fevereiro	29	86	115
Março	28	44	72
Abril	42	70	112
Maio	24	36	60
Junho	18	9	27
Julho	21	34	55
Agosto	7	11	18
Setembro	2	9	11
Outubro	5	1	6
Novembro	12	2	14
Dezembro	15	28	43
Janeiro	27	36	63
<b>Total</b>	<b>230</b>	<b>366</b>	<b>596</b>

TABELA 7. Números de emergências de machos e fêmeas de *Centris analis* separados somente pelas duas estações: quente e úmida, fria e seca.

<b>Estações</b>	<b>Fêmea</b>	<b>Macho</b>	<b>Total</b>
Estação quente	116	197	313
Estação fria	114	169	283
p	0, 895082*	0, 143308*	0, 219129*
<b>Total</b>	<b>230</b>	<b>366</b>	<b>596</b>

\* Não apresentam diferenças significativas

## 4.2. Análise Genética

### 4.2.1 Análise alozimica

Foram analisados 191 adultos de três espécies distintas – *C. tarsata*, *C. analis* e uma espécie não identificada - para detecção de polimorfismos enzimáticos. As análises foram feitas com o material advindo dos ninhos de Araras, Rifaina e Ribeirão Preto, além de 21 indivíduos coletados na área urbana de São Carlos em flores de *Tecoma stans*.

Dos 20 sistemas enzimáticos testados para *C. tarsata*, correspondentes a 26 locos gênicos, sete apresentaram polimorfismo e foram utilizados para realizar as análises genéticas e traçar a estrutura sociogenética intranidal. Estabelecido o perfil eletroforético dos sistemas enzimáticos, foi possível interpretar geneticamente as variantes observadas nos géis como produtos da ação de alelos. Assim, as regiões (bandas) foram denominadas de acordo com sua mobilidade, sendo que as mais anódicas receberam numeração menor (TABELA 8). Em *C. analis* também foram testados 20 sistemas enzimáticos, e encontramos variantes enzimáticas de esterases, Pgm e Hbdh. Contudo, ao analisar 90 indivíduos, somente quatro

apresentaram variantes eletroforéticos para tais marcadores, não sendo possível, portanto utilizar alozimas para traçar a estrutura sociogenética intranidal dessa espécie.

A análise comparativa dos perfis eletroforéticos das três espécies de *Centris* analisadas revela que estas espécies podem ser facilmente diferenciadas por vários dos sistemas enzimáticos. Os melhores locos diagnósticos são os que apresentam variação inter-específica e monomorfismo intra-específico, como é o caso da MDH.

TABELA 8- Sistemas enzimáticos com sua migração no gel e presença (sim) ou ausência (--) de variação.

Sistemas Enzimáticos	Variação?	Alelos	
		<i>C. tarsata</i>	<i>C.analis</i>
Esterase-1	--		
Esterase-2	--		
Esterase-3	Sim	(100), (75) e (60)	Sim (120), (100) e (80)
Esterase-4	Sim	(100) e (90)	Sim (100) e (60)
6- Fosfogliconato desidrogenase	--	(100) e (95)	
Aconitase-c	--		
Aconitase-m	--		
Adenilato Quinase	--		
Aldolase-1	--		
Arginina quinase	--		
Fumarato hidratase	--		
Glicose-6-fosfato desidrogenase	--		
Glucose fosfato isomerase	--		
$\beta$ -Hidroxi butirato desidrogenase	Sim	(130), (100) e (50)	Sim (100) e (80)
Hexoquinase	--		
Isocitrato desidrogenase	Sim	(150) e (100)	
Lap	--		
Malato desidrogenase-c	--		
Malato desidrogenase-m	--		
Enzima málica	Sim	(130) e (100)	
Peptidase-A	Sim	(140) e (100)	
Fosfoglucomutase	--		Sim (120) e (90)
Fosfatase Ácida	--		
Superóxido dismutase	--		
$\alpha$ -Glicerofosfato desidrogenase-1	--		
$\alpha$ -Glicerofosfato desidrogenase-2	--		



As análises de alozimas em amostras de *C. analis*, como esperado, revelaram um perfil eletroforético distinto de *C. tarsata*.

Segue a descrição detalhada dos sistemas que apresentaram variação para *C. tarsata*:

### Esterases

Foram feitas colorações utilizando dois substratos fluorogênicos: butirato de umbeliferona (BU) e propionato de umbeliferona (PU). As bandas com melhor nitidez resultaram da associação do tampão tris-citrato pH 7,5 (10x) com o substrato BU. Os locos das esterases 1 e 2 não apresentaram variantes.

### Esterase-3 (Est-3)

Em parte das amostras analisadas, verificou-se baixa resolução eletroforética da esterase-3 e, por esta razão, não foi possível caracterizar qualquer polimorfismo nesta região. Entretanto, análise posterior de novas amostras levou à detecção de três variantes eletroforéticas: F (100), M (75) e S (60).

### Esterase-4 (Est-4)

Essa esterase apresentou polimorfismo e duas variantes foram caracterizadas, F (100) e S (90).

### 6- Fosfogliconato desidrogenase (6PGD)

Esse loco enzimático apresentou polimorfismo, sendo observadas as variantes F (100) e S (95) (FIGURA 20).

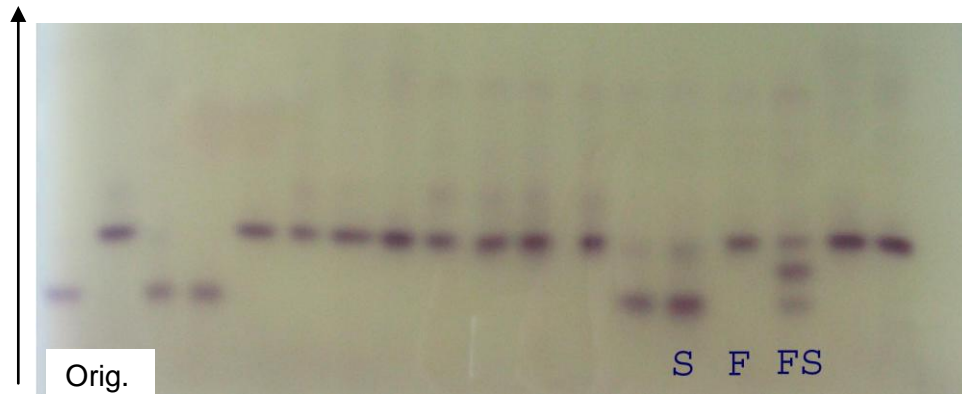


FIGURA 20. Variantes eletroforéticas de 6-fosfogliconato desidrogenase (6-PGD) após eletroforese em gel de amido a 14% em tampão TC ph 7.5 e coloração histoquímica.

#### $\beta$ -Hidroxiacetato desidrogenase

Esse sistema enzimático apresentou três variantes F (130), M (100) e S (50), determinadas geneticamente por três alelos de um loco gênico de ação codominante (FIGURA 21).

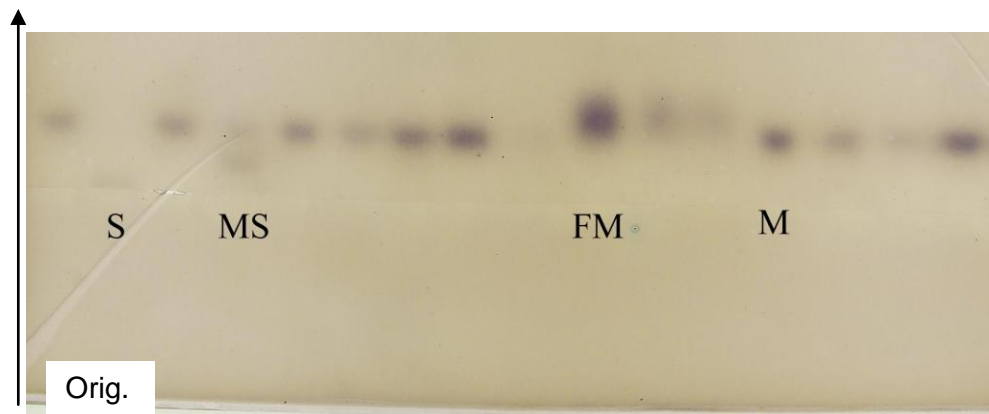


FIGURA 21. Variantes eletroforéticas de  $\beta$ -Hidroxiacetato desidrogenase (*Hbdh*) em gel de amido a 14% reveladas histoquimicamente.

#### Isocitrato desidrogenase

O sistema enzimático ICD apresentou somente um loco gênico com 3 alelos e padrão eletroforético de enzima dimérica (três bandas no presumido heterozigoto).

Com o tampão Tris-citrato pH7,5 (10x), a coloração para ICD evidenciou uma região de atividade. As variantes encontradas foram F (150) e S (100) (FIGURA 22).

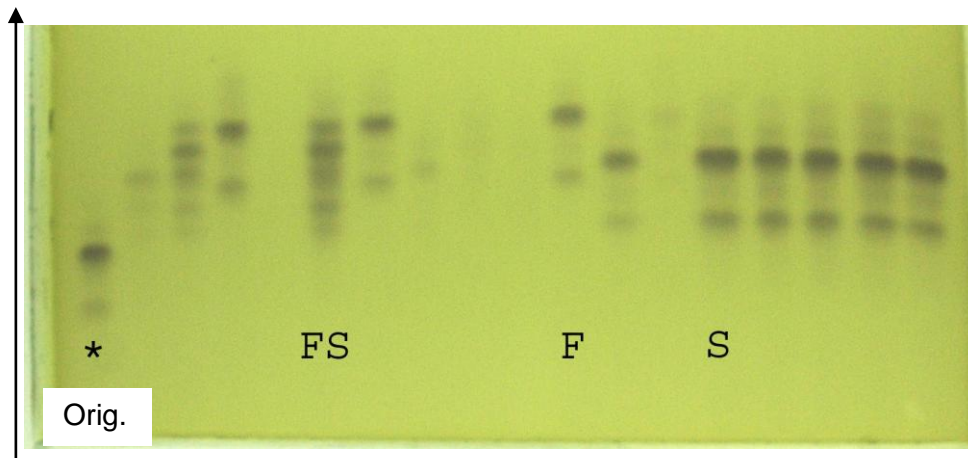


FIGURA 22. Variantes eletroforéticas de isocitrato desidrogenase (*Icd*) em gel de amido de milho 14% em tampão TC 10x (com NADP).

\* exemplar de *Centris analis*

### Enzima málica

Esse sistema enzimático apresentou somente um loco, cujo polimorfismo resulta em duas variantes distintas, F (130) e S (100).

### Pep-A

Esse sistema mostrou-se polimórfico e duas variantes eletroforéticas foram caracterizadas, F (140) e S (100) (FIGURA 23).

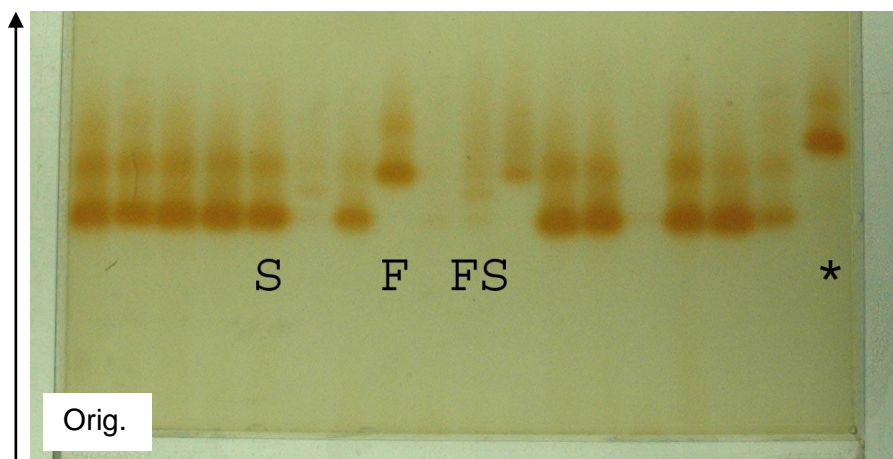


FIGURA 23. Variantes eletroforéticas de Peptidases (*Pep-A*) em gel de amido de milho 14% com tampão TCB, reveladas histoquimicamente.

\* amostra de *Centris analis*

Segue a descrição detalhada dos sistemas que apresentaram variação para *C.analis*.

### Esterases

As colorações foram feitas utilizando como substrato propionato de umbeliferona (PU). Os locos das esterases 1 e 2 não apresentaram variantes.

#### Esterase-3 (Est-3)

Em grande parte das amostras analisadas, verificou-se baixa resolução eletroforética da esterase-3, mas foi possível detectar polimorfismo em algumas amostras, e duas variantes eletroforéticas: F(100) e S(60).

#### Esterase-4 (Est-4)

Essa esterase também apresentou baixa resolução, contudo ainda assim foi possível detectar três variantes eletroforéticas: F(120), M(100) e S(80).

#### $\beta$ -Hidroxibutirato desidrogenase

Esse sistema enzimático apresentou duas variantes F (100) e S (80), somente um indivíduo apresentou variação.

#### Fosfoglucomutase

Esse sistema enzimático apresentou duas variantes F (120) e S(90), mas somente em poucos indivíduos, não podendo ser devidamente caracterizado.

#### 4.2.2 RFLP-PCR do DNA mitocondrial

Análises realizadas permitiram amplificar boa parte do gene Cyt b de *C. analis* e *C. tarsata*. Analisando a seqüência deste gene mitocondrial de *Centris inermis* (Cameron & Mardulyn 2001), obtida com o uso do primer CB-N-11367 5'-ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT-3' (Simon *et al.* 1994), o mesmo utilizado em nossa reação de amplificação (FIGURAS 22 e 23), verificamos que esta região apresentava sítios de corte para a enzima *DraI*, o que foi confirmado (FIGURA 24). Outras enzimas deverão ser testadas em trabalho futuro para digestão deste fragmento, entre as quais *Mbol* e *Vspl*.



FIGURA 24. Fragmento amplificado por PCR correspondente à região cyb b de *Centris tarsata*



FIGURA 25. Fragmento amplificado por PCR correspondente à região cyb b. As amostras correspondem a: 1-3: *Centris tarsata*; 4-8: *Centris analis*; 9: *Apis mellifera*.

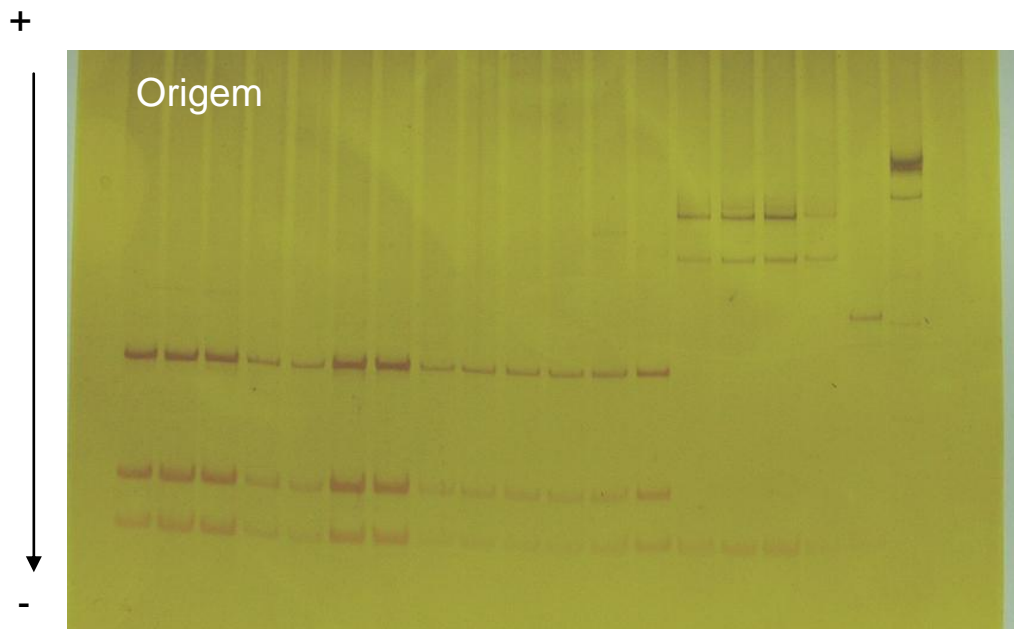


FIGURA 26. Padrões de digestão de Cyt b com *Dral*. As amostras 1-13 correspondem a *Centris tarsata*, 14-18 a *Centris analis* e 19, a *Apis mellifera*.

A região de citocromo b das espécies do gênero *Centris* sofreram digestão com a enzima *Dral* e foi observado um polimorfismo em *Centris analis*.

### 4.2.3 DNA mitocondrial e microssatélites

Dos exemplares de *C. tarsata* o DNA total já se encontra extraído e alíquotas deste foram utilizadas para a amplificação das regiões mitocondriais cyt b e COI (FIGURA 25). Futuramente, estes dados poderão contribuir para se realizar medidas indiretas de dispersão e verificar quais são os padrões maternos dessas abelhas nos materiais de ninhos que possuímos de coletas de anos anteriores.

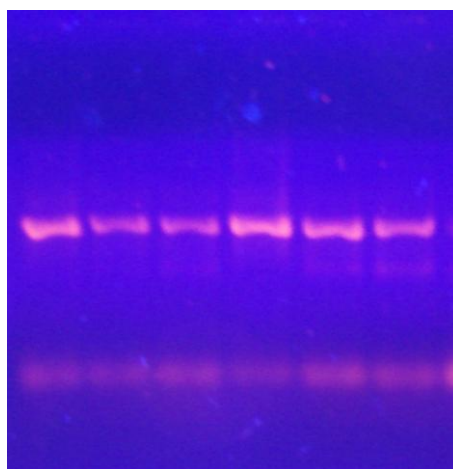


FIGURA 27. Gel de agarose 1% corado com GelREd para revelar fragmento do gene COI amplificado por PCR em amostras de *C. analis*.

A extração também está sendo realizada para a confecção de uma biblioteca genômica para a prospecção de regiões de microssatélites espécie - específicos para o estudo mais detalhado da composição dos ninhos das espécies de *C. tarsata* e *C. analis*.

O produto da amplificação da região mitocondrial COI foi seqüenciado para 48 amostras de *C. analis* de Ribeirão Preto, sendo que cada indivíduo é representante de um tubo de colorset, ou seja, de um ninho distinto, e foi encontrado um fragmento de 465 pares de bases, cuja seqüência consenso é:

```

Consensus      . . . . . TTAA  TTTTACCAGG  GTTTGGATTA  ATTTCTCAAA  TTATTATAAA
TGAAAGTGGA    AAAAAAGGAA  CTTTCGGTAA  CTTAGGAATA  ATTTATGCAA  TATTAGGAAT
TGTATTTTAA    GGATTTACCG  TTTGAGCTCA  TCATATATTT  ACTGTTGGAT  TAGATGTTGA
TAGTCGAGCC    TATTTACAT   CAGCAACAAT  AATTATTGCA  GTTCCAACAG  GTATTAAAGT
ATTTAGACGA    TTAGCTACAT  ATCATGGAGC  AAAATTAAAC  TACAATAACT  CAATTTTATG
ATCCATAGGA    TTTATCCTTT  TATTTACTAT  ATGAGGATTA  ACAGGAATTT  TATTATCAAA
TTCCTCTATC    GATATCATAAC  TTCATGATAC  TTATTATGTA  GTAGCTCATT  TTCATTATGT
TCTATCAATA    GGAGCAGTTT  TTTCAATCAT  TTCAAGTTTT  ATTCACTGAT  TCCATTTAAT
T. . . . .

```

Esse fragmento, quando blastado no NCBI, encontra como seqüência mais próxima o COI de diversos himenópteros, como *Ctenoplectra polita*, com o número de acesso [EU122095.1](#), com 86% de identidade. Outras espécies de corbiculados apresentaram grande semelhança e, dentre essas, espécies de Euglossini, como *Exaerete smaragdina* [EU421457.1](#), *Exaerete frontalis* [AY506481.1](#) ambas com 86% de identidade.

#### Teste de primers microssatélites heterólogos

Foram realizados testes com primers heterólogos com amostras de algumas famílias de *C. analis* e, apesar de que tais primers levaram à amplificação de fragmentos, não foi encontrado polimorfismo com tal marcador (FIGURAS 28 e 29).



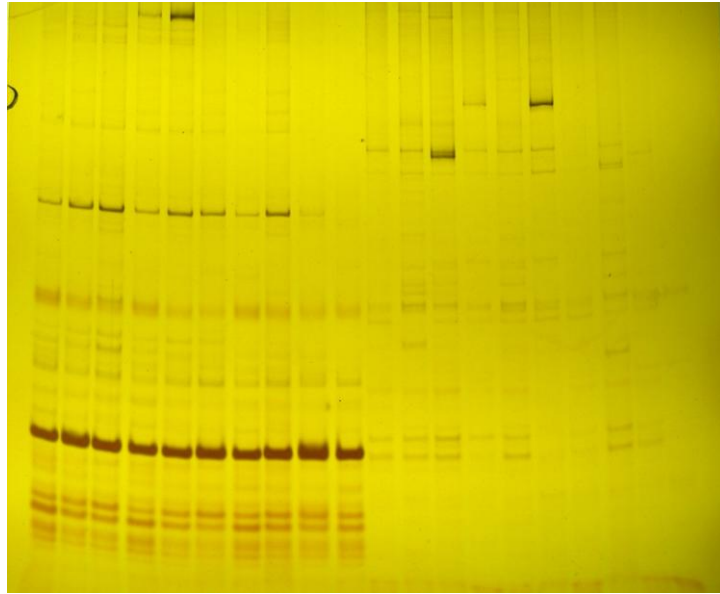


FIGURA 28. Testes dos primers de microssatélites de *Tripoxylon albitarse* Talb 02 e Talb 03, respectivamente, em famílias de *Centris analis*.

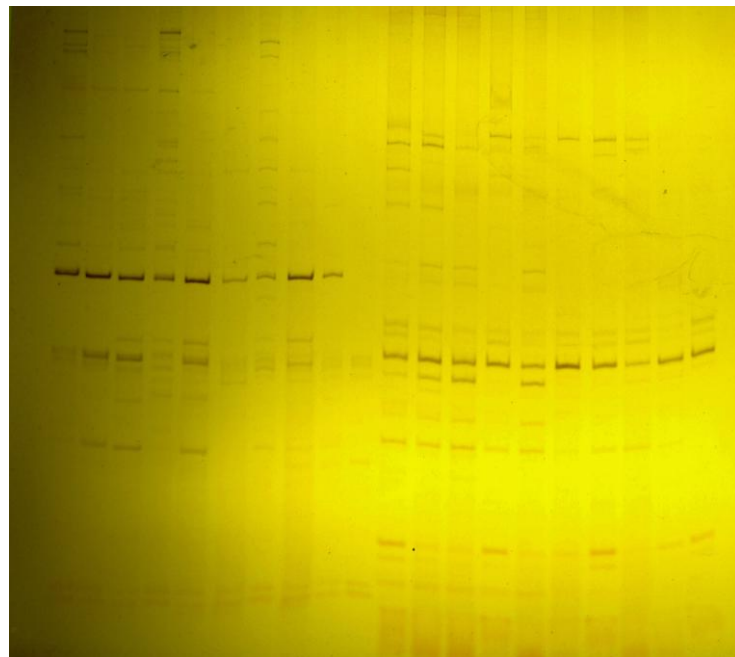


FIGURA 29. Testes dos primers de microssatélites de *Tripoxylon albitarse* Talb 05 e Talb 07, respectivamente, em famílias de *Centris analis*.

## 4.4 Análises de dados

### 4.4.1 Dados genéticos

A análise parcial dos dados obtidos com os adultos de *C. tarsata* emergidos no laboratório demonstrou a ocorrência de sete locos polimórficos dentre 26 locos analisados, o que resultou em 27% de locos polimórficos.

A população de *C.tarsata* analisada apresentou a maioria de seus locos monomórficos e os locos polimórficos apresentaram freqüências genótípicas de acordo com o modelo de equilíbrio genético (equilíbrio de Hardy-Weinberg).

Os ninhos analisados obedeceram ao padrão esperado de monandria/monoginia, pois os genótipos presentes na progênie da grande maioria dos ninhos podem ser explicados pelo acasalamento único da fêmea responsável pela cria encontrada em cada ninho (PLANILHA 1 - ANEXO). Durante as coletas, conseguimos coletar uma fêmea provisionando o seu ninho; contudo, os fenótipos eletroforéticos da fêmea e sua progênie não trouxeram dados suficientemente consistentes, sendo que o sistema mais informativo foi HBDH, em que essa fêmea era heterozigota e sua prole - um macho e duas fêmeas - eram homozigotos (ver família 9 da PLANILHA 1 - ANEXO).

As análises realizadas para a espécie *Centris analis* não revelaram variantes eletroforéticas que possibilitassem inferências sobre a estrutura genética dos ninhos analisados.

#### 4.4.2 Dados ecológicos

##### 4.4.2.1 Razão sexual

###### *Centris tarsata*

Para os indivíduos de *C. tarsata* coletados em Araras, a razão sexual igual a 1:1 foi confirmada por meio do teste de qui-quadrado, já que a amostra analisada era constituída de 38 fêmeas e 39 machos. De acordo com o teste t de Student ( $t = 8,95$ ;  $p < 0, 0001$ ), feito após confirmação da normalidade da distribuição dos pesos por meio do teste de D'Agostino, as massas corpóreas dos diferentes sexos possuem médias distintas. Enquanto os machos apresentaram média igual a  $72.63 \pm 9.39$  mg (FIGURA 32), as fêmeas têm média igual a  $104.33 \pm 19.18$  mg (FIGURA 33), estando a alocação sexual desviada para fêmeas.

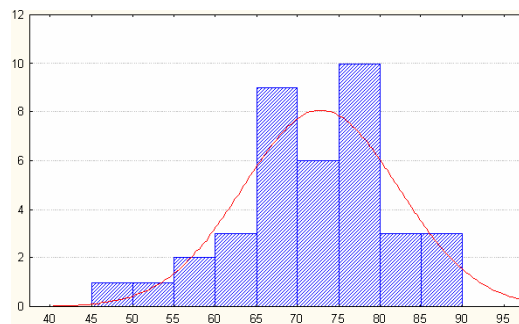


FIGURA 30. Número de indivíduos e distribuição dos valores de massa (em mg) em machos de *Centris tarsata*

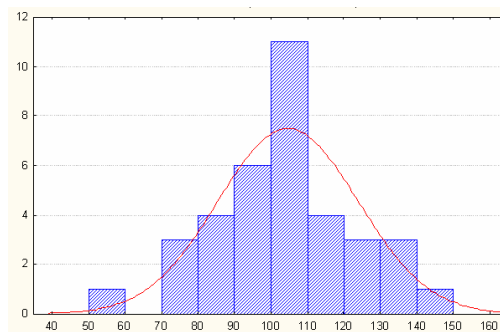


FIGURA 31. Número de indivíduos e distribuição dos valores de massa (em mg) das fêmeas de *Centris tarsata*

Como as fêmeas apresentaram um grande desvio padrão, análises foram feitas considerando as médias da massa das fêmeas de ninhos com mais do que duas fêmeas. As médias foram submetidas a teste t e não foram encontradas diferenças nas médias das amostras dos ninhos. Outra análise realizada foi em relação à massa de fêmeas do período 2006/2007 vs. fêmeas do período 2007/2008, já que uma diferença havia sido detectada. Entretanto, os valores do teste t indicaram que tais diferenças não eram significativas.

### *Centris analis*

A razão sexual de *C.analis* foi feita a partir de indivíduos emergidos de ninhos coletados na USP–RP. Como esta atividade de nidificação foi acompanhada durante um ano ininterrupto, foi possível averiguar a razão sexual observada em cada mês ao longo deste período, bem como a Razão Sexual total, como o demonstra a tabela abaixo (TABELA 9). De acordo com o teste t de Student, feito após confirmação da normalidade da distribuição dos pesos por meio do teste de D´Agostino, as massas corpóreas dos diferentes sexos possuem médias distintas. Enquanto os machos apresentaram média igual a  $60,13 \pm 9,19$  mg, as fêmeas têm média igual a  $68,85 \pm 10,79$  mg, estando a alocação sexual desviada para fêmeas.

TABELA 9 - Fêmeas e machos emergidos e razão sexual em *Centris analis*

<b>Meses</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>Machos</b>	<b>Razão sexual</b>
Fevereiro	29	86	1:2,96*
Março	28	44	1:1,57
Abril	42	70	1:1,66*
Mai	24	36	1:1,5
Junho	18	9	1:0,5
Julho	21	34	1:1,62
Agosto	7	11	1:1,57
Setembro	2	9	1:4,58*
Outubro	5	1	1:0,2
Novembro	12	2	1:0,16*
Dezembro	15	28	1:1,86*
Janeiro	27	36	1:1,33
<b>Total</b>	<b>230</b>	<b>366</b>	<b>1: 1,59*</b>

\* RS significativamente diferente de 1:1 para  $\alpha = 0,05$

#### 4.4.2.2 Sazonalidade

A partir dos dados de nidificação de *C. analis*, particularmente os obtidos em ninhos provenientes de Ribeirão Preto, pudemos observar que existe uma sazonalidade na nidificação, havendo uma predominância de nidificação e emergências (FIGURA 34) nos meses quentes e úmidos do ano, de março até abril; entretanto, não houve a interrupção de nidificação e nem da emergência. Em Araras, as fêmeas de *C. tarsata* não apresentaram o mesmo comportamento, já que em

alguns meses não ocorreu provisionamento de ninhos, mas as nidificações também ocorreram preferencialmente nos meses quentes e úmidos.

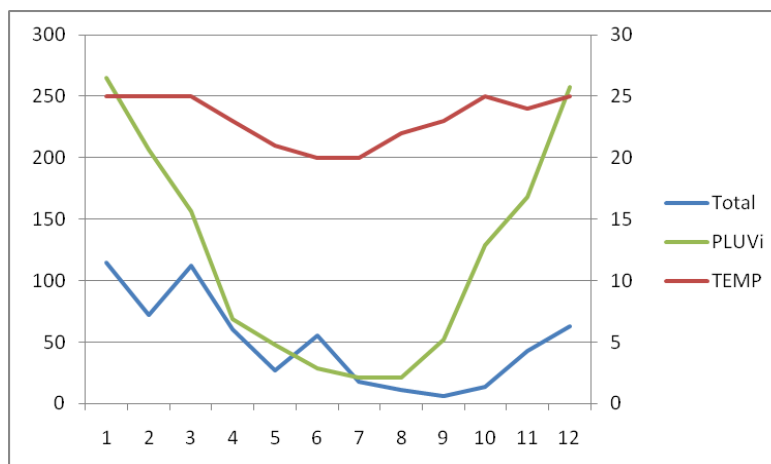


FIGURA 32. Gráfico mostrando linhas de tendência do total de indivíduos emergidos de *Centris analis*, pluviosidade e temperatura ao longo do ano de 2009.

TABELA 10- Coeficientes de Correlação de Pearson que relacionam a quantidade de indivíduos de *Centris analis* que emergiram com as condições climáticas: pluviosidade e temperatura.

Fatores analisados	Coefficiente de Pearson
Total/Pluviosidade	0,682004*
Total/Temperatura	0,505288*
Fêmeas/Pluviosidade	0,630067*
Fêmeas/Temperatura	0,510954*
Machos/Pluviosidade	0,672163*
Machos/Temperatura	0,478763*
Razão Sexual/ Temperatura	-0,04454
Razão Sexual/Pluviosidade	0,037874

\* Coeficiente de Correlação de Pearson moderado

#### 4.4.2.3 Desenvolvimento

Ao acompanhar a nidificação de *Centris analis* ao longo de um ano, pudemos observar a grande diferença apresentada no tempo de emergência (TABELA 11):

TABELA 11- Tempo (em dias) de desenvolvimento médio de *Centris analis*, do fechamento do ninho à emergência dos imagos.

<b>Mês</b>	<b>Tempo (em dias) de desenvolvimento (média)</b>
Março	37,8
Abril	45,2
Maio	55,2
Junho	68,8
Julho	79
Agosto	70,8
Setembro	57,8
Outubro	55,2
Novembro	44,5
Dezembro	40,3
Janeiro	44,1
Fevereiro	39,3

Analises utilizando o Coeficiente de Correlação de Pearson encontraram correlação negativa entre o tempo de desenvolvimento (da oviposição à emergência) de *Centris analis* e as condições climáticas de temperatura e pluviosidade dos meses em questão (TABELA 12).

TABELA 12- Coeficiente de Correlação de Pearson entre temperatura e tempo de desenvolvimento (da oviposição à emergência) de *Centris analis* e pluviosidade e tempo de desenvolvimento.

<b>Tempo de desenvolvimento</b>	
<b>Temperatura</b>	-0,81392*
<b>Pluviosidade</b>	-0,7995*

\* Coeficiente de Correlação de Pearson forte



## 5. Discussão

O presente trabalho foi realizado com duas espécies extremamente importantes da fauna de abelhas solitárias brasileiras, *C. analis* e *C. tarsata*. Essas espécies apresentam tal relevância por serem polinizadoras tanto de ecossistemas naturais, quanto de culturas como a acerola (OLIVEIRA & SCHLINDWEIN 2009). Por isso, essas espécies são citadas no programa da Iniciativa Brasileira de Polinizadores (IMPERATRIZ-FONSECA & DIAS 2004), pois além das razões supracitadas, também podemos incluir a relativa abundância, pelo menos se considerarmos que se trata de abelhas solitárias, e a maior facilidade de captura e manejo através dos ninhos-armadilha (MORATO *et al.* 2000, MADEIRA-DA-SILVA & MARTINS 2006, GAROFALO *et al.* 2004).

Além de trabalhar com tais espécies que são pouco estudadas, essa dissertação analisa aspectos genéticos desses organismos, que foram utilizados somente em estudos comparativos, utilizadas como grupos externos (CAMERON & MARDULIN 2001). A maioria dos trabalhos com esses indivíduos são relativos à sua biologia de nidificação (SILVA *et al.* 2001, JESUS & GARÓFALO 2000) ou estudos de interações com plantas (SILVA 2007, CORREIA *et al.* 2004). Contudo, poucos trabalhos foram realizados associando a biologia de nidificação dessas espécies com aspectos de genética de populações, como está sendo realizado no presente trabalho.

A biologia de nidificação de *C. tarsata*, assim como de *C. analis*, foi estudada em populações provenientes de uma localidade para cada espécie, já que nestas foi possível obter amostras em quantidade suficiente para realizar tais análises. Amostras de outras localidades, em número reduzido, foram utilizadas para os estudos genéticos, como controle. Em Araras, coletamos ninhos de *C. tarsata*; em Ribeirão Preto, a atividade de nidificação de *C. analis* foi intensa e uniformemente distribuída ao longo do ano e, a partir dessas amostras, foi possível inferir aspectos importantes da nidificação dessas espécies. Na literatura, são encontrados alguns trabalhos realizados com a biologia de nidificação e comparações podem ser realizadas com trabalhos já publicados sobre essas espécies em outras localidades do país. Nos ninhos acompanhados, houve pouca diferença entre a emergência do

primeiro e último indivíduo do mesmo ninho, demonstrando que o tempo de desenvolvimento de irmãos que compartilham o ninho é semelhante e a diferença na emergência pode ser referente ao tempo de construção das células e provisionamento pela fêmea, e à posição da célula, sendo que os machos emergem antes das fêmeas. Entretanto, observações em campo devem ser feitas a esse respeito e não podemos descartar que indivíduos de sexo e até mesmo genótipos e ambientes diferentes podem ter seu tempo de desenvolvimento alterado.

Estudos realizados com espécies que nidificam em ninhos-armadilha constantemente apresentam um grave problema, o elevado grau de mortalidade quando os ninhos são transportados para o laboratório a perda de imaturos é próxima à 50% em diversos estudos realizados com ninhos-armadilha (FREEMAN & JAYASINGH 1975; CROSS *ET AL.* 1975; JAYASINGH & FREEMAN 1980; TEPEDINO & FROHLICH 1982; TEPEDINO & PARKER 1983; PARKER 1986). Os ninhos de *C. analis* de Ribeirão Preto, após a transferência para o laboratório, sofreram infestação por fungo que atingiu vários ninhos; no entanto, depois de algumas mudanças na forma de fechamento dos ninhos, esse problema foi minimizado e os índices de mortalidade foram reduzidos. A população de *Centris analis* do campus de Ribeirão Preto já foi estudada algumas vezes e em alguns casos a mortalidade nos ninhos armadilha foi superior a 50% (VIEIRA-DE-JESUS & GARÓFALO 2000) e em outros estudos foi igual ou inferior a 50% (GAZOLA & GARÓFALO 2003; COUTO & CAMILLO 2007). A causa da mortalidade difere na maioria dos casos entre parasitismo e causas desconhecidas e ocorrem nos estágios iniciais de desenvolvimento (ovo ou primeiro instar larval) (VIEIRA-DE-JESUS & GARÓFALO 2000; GAZOLA & GARÓFALO 2003; AGUIAR *et al.* 2005; COUTO & CAMILLO 2007).

Nas localidades em que as fêmeas de *Centris ssp* nidificaram pudemos observar a predominância de uma espécie em relação a outras espécies, mesmo em locais que não existe nenhum controle de quais espécies estão nidificando, como ocorria em Araras. Holt (1977) propôs o termo “competição aparente” para indicar a redução da densidade populacional de uma espécie quando a densidade de uma segunda espécie aumenta, sendo esta interação mediada pelo aumento numérico de uma terceira espécie de um nível trófico superior.

Com relação à sazonalidade, tanto *C. tarsata* quanto *C. analis* apresentaram padrões semelhantes de nidificação - prioritariamente nos meses quentes e secos. No entanto, as duas espécies apresentaram diferenças nos meses frios e secos, quando não houve nenhuma nidificação de *C. tarsata* em Araras. Este fato pode ser devido ao fato de que a temperatura média de Ribeirão Preto é de 23.2°C, mais elevada que a de Araras - 21.6°C; nos meses mais frios, também ocorre uma diferença nas temperaturas das cidades, sendo a média mínima de Ribeirão Preto 2.1°C mais alta que a de Araras. Mesmo a classificação climática das duas cidades conforme Koppen é distinta, sendo Ribeirão Preto Aw (clima tropical úmido com inverno seco) e Araras Cwa (clima temperado úmido) (fonte: CEPAGRI). Esse padrão de nidificação nos meses quentes e úmidos é corroborado por diversos estudos realizados com espécies Neotropicais, bem como em outros estudos realizados com *C. tarsata*, *C. analis* e outras espécies de *Centris* (AGUIAR & GAROFALO 2004, COVILLE *et al* 1983, JESUS & GAROFALO 2000, PEREIRA *et al* 1999). Contudo, a análise correlacionando a nidificação com o índice pluviométrico de cada mês e com as médias de temperatura não estabeleceu correlação consistente entre tais variáveis e a nidificação de *Centris analis*, espécie para a qual foi possível a aplicação do índice de Pearson.

Em *Centris tarsata*, a nidificação e emergência estiveram restritas aos meses de outubro/2006 a fevereiro/2007, correspondente à estação quente e chuvosa. Novas nidificações e emergências ocorreram somente na primavera de 2007, sendo observadas nidificações ao final de setembro e as primeiras emergências em fins de outubro. Estes resultados indicam que essas abelhas apresentam sazonalidade relacionada não somente à estação chuvosa e quente, mas também que a nidificação ocorre concomitantemente com o início da primavera, possivelmente por alterações de temperatura e fotoperíodo relacionadas com esta época do ano. Já há literatura a respeito do efeito da temperatura e do fotoperíodo em espécies de *Centris* (COUTO & CAMILLO 2007), levando em consideração que a nidificação foi reiniciada antes das primeiras chuvas.

A presença de indivíduos em diapausa também está de acordo com trabalhos prévios (AGUIAR & GARÓFALO 2004) em *Centris tarsata*, em que foram observados indivíduos em diapausa durante a estação seca e fria. Dentre os indivíduos que passaram a estação seca como larvas, somente um teve seu

desenvolvimento concluído, o que pode ter sido ocasionado pela manipulação do ninho. Contudo, mesmo esse indivíduo não emergiu, embora aparentemente apresentasse desenvolvimento normal completo. Esse fato requer novas análises, já que são encontrados diversos adultos dentro de células que não emergiram e esse fato pode estar relacionado com algum gene relacionado à capacidade de desoperculação, como já demonstrado em *Apis mellifera*. Como em *C. analis* houve continuidade na nidificação e emergência, não podemos falar especificamente em diapausa, mas houve um significativo aumento no tempo de desenvolvimento.

O desenvolvimento foi acompanhado principalmente na população de *Centris analis* de Ribeirão Preto, pois como acompanhávamos diariamente, tínhamos controle de quando cada ninho foi finalizado e do momento em que emergiam os imagos. Apesar de não apresentar interrupção na nidificação e nas emergências, nas estações mais frias do ano houve um aumento significativo no tempo de desenvolvimento. As médias estimadas variaram entre 38 dias em março de 2009 a 79 dias em julho de 2010. Ao aplicar a correlação de Pearson, foram encontrados coeficientes negativos, tanto para a relação entre temperatura e tempo de desenvolvimento, quanto para a relação de pluviosidade e tempo de desenvolvimento, confirmando assim que essa espécie, apesar de não ter sua nidificação interrompida durante a estação fria e seca, altera drasticamente o tempo de desenvolvimento

Em relação à dispersão, ainda não foi possível fazer nenhuma predição, pois não foram realizados os trabalhos de marcação e recaptura e não dispomos de dados suficientes para estimativa de dispersão indireta através de fluxo gênico. A sazonalidade dependente da ocorrência de abelhas nas árvores de *Tecoma stans* não teve progressos, porque com a restrição do trabalho a duas espécies, as mesmas não foram encontradas em abundância nas árvores para realização desse estudo.

Os dados genéticos obtidos são relativos às análises alozímicas em amostras de ninhos coletados de *C. tarsata*; também tivemos sucesso na padronização das condições de PCR para estudos de genes mitocondriais, o que nos permitiu seqüenciar partes dos genes Cyt b e COI e obter dados sobre a população dos ninhos de Ribeirão Preto. Em relação aos marcadores microsatélites, não foram

desenvolvidos primers específicos, mas testes com outras espécies tiveram regiões amplificadas, sendo necessários maiores estudos com famílias, para saber se ocorre polimorfismo nesses locos e se o mesmo tem caráter genético.

Os dados evidenciaram que essas abelhas apresentam polimorfismos que podem ser explicados por bases genéticas, tendo sido encontrados sete locos enzimáticos polimórficos em *C. tarsata*. Este número de locos polimórficos foi adequado para se traçar o padrão da genética familiar e populacional, pelo menos no que se refere a *C. tarsata*, espécie que apresentou polimorfismos genéticos na população amostrada. Por meio desses polimorfismos pudemos fazer predições sobre a estrutura sociogenética intranidal dessa espécie, como monoandria/monoginia como é o esperado para espécies solitárias. No entanto, um dos ninhos de *C. tarsata* (família 4, ver Anexo) não se encaixou no padrão esperado - deste ninho emergiram 11 imagos, três dos quais apresentaram um padrão de Est-3 incompatível com monoginia, indicando que mais de uma fêmea ovipositou no mesmo ninho.

Para *C. analis*, realizamos também análises alozímicas; entretanto, não encontramos polimorfismos informativos, pois somente quatro indivíduos apresentaram variantes eletroforéticas. Essa baixa variação genética dos himenópteros já está fartamente documentada e Crespi (1991) já se referia a tal diferença das espécies desta ordem em relação a outros insetos. Existem algumas teorias que tentam explicar essa baixa variabilidade, como a presença de haplodiploidia, que reduz o tamanho efetivo da população, aumenta a taxa de fixação dos alelos, dificulta a obtenção de um polimorfismo estável e aumenta a ligação gênica e o “efeito carona” devido aos menores níveis de recombinação (CROZIER 1971; PAMILO & CROZIER 1981; OWEN 1985).

Um investimento maior será realizado no teste de primers heterólogos para análise de microssatélites em *C. tarsata* e *C. analis*, de forma a contar com ferramenta com um maior poder de identificação dos parentais dos ninhos e também para definir se ocorre estruturação populacional nessas espécies.

O seqüenciamento de COI foi realizado para espécimes de *C. analis* de Ribeirão Preto provenientes de 46 ninhos (tubos de colorset) distintos. A similaridade nas seqüências mostra que a população que nidifica nesta localidade possui somente um haplótipo para esse gene mitocondrial. O fragmento seqüenciado possui 465 pares de bases, e apresentou boa similaridade com outras espécies de

himenópteros, e mais especificamente com muitos corbiculados, podendo ser um bom indicativo da proximidade filogenética de *C. analis* com os mesmos. Principalmente com a tribo Euglossini, que segundo algumas filogenias seriam a mais basal dentro destes (CAMERON 2004). A ocorrência de um único haplótipo parece sugerir que a área foi colonizada por uma linhagem materna, dado a herança uniparental deste marcador. Se este achado se confirmar em análises subsequentes, o crescimento da população local se dá com a fundação de novos ninhos pelas fêmeas da geração anterior que compartilham o mesmo DNA mitocondrial de suas mães. Portanto, os dados parecem indicar que as fêmeas de *Centris* apresentam comportamento filopátrico. Considerando o mecanismo peculiar de determinação do sexo nos himenópteros, é esperado que os machos sejam o sexo dispersor, de forma a garantir a ocorrência de fluxo gênico e dificultar a ocorrência de acasalamentos entre aparentados.

A razão sexual é influenciada por vários fatores, como a abundância de recursos florais (TORCHIO & TEPEDINO 1980), e a dimensão das cavidades disponíveis pode alterar a razão sexual de espécies que nidificam em cavidades preexistentes (RUST 1998; BOSCH & VICENS 2006), e essa influência pode ser notada em estudos que utilizam ninhos-armadilha com dimensão pré-determinada (ALONSO 2008). A razão sexual está de acordo com Fisher (1930) para as amostras de *C. tarsata* coletadas em Araras, em que a proporção esperada de machos e fêmeas é de 1:1 para uma população panmítica. Contudo, existem diferenças significativas na massa corporal dos machos e das fêmeas, evidenciando desvios na alocação sexual para as fêmeas nessa espécie. Se os recursos fossem igualmente distribuídos entre os sexos, seria esperado um desvio da razão sexual para machos, já que é mais custoso produzir uma fêmea. Os nossos resultados não podem ser considerados conclusivos, dado o número relativamente baixo de indivíduos analisados, além de ser importante ressaltar que para *Centris tarsata* foram disponibilizados ninhos-armadilha de bambu, com diâmetros e comprimentos variados, o mesmo encontrado por Aguiar & Garófalo (2004) nessa mesma situação. Entretanto, o quadro para *Centris analis* é distinto, sendo a razão sexual diferente de 1:1 esperado (FISHER 1930), resultado oposto ao encontrado por Vieira-de-Jesus & Garófalo (2000) e Couto & Camillo (2007) para a mesma espécie. Observando essas populações diariamente e com um número maior de amostras, percebemos que existem diferenças mensais da razão sexual, tendo meses que a mesma se

inverte como aconteceu em junho. Não foram realizadas pesagens de parte dos indivíduos emergidos, mas é notável que o dimorfismo sexual, pelo menos no que se refere à diferença de tamanho entre machos e fêmeas, é menor em *C. analis*, o que pode ser uma das possíveis causas dessa diferença na razão sexual. Entretanto, a maior amostragem e o acompanhamento durante o período de um ano pode ter influenciado na diferença encontrada para as duas espécies em questão.

## 6. Considerações finais e Perspectivas

O estudo dos ninhos de duas espécies de *Centris* que nidificam comumente em ninhos-armadilha nos permitiu observar algumas semelhanças nesses organismos, principalmente relacionados com a sazonalidade, sendo que as espécies nidificam prioritariamente nos meses quentes e úmidos. Contudo, os dados mais consistentes em relação à biologia da nidificação foram obtidos em *Centris analis*. Ninhos desta espécie foram acompanhados durante um ano inteiro, verificando-se atividade de nidificação durante o ano inteiro. Este dado nos leva a concluir que essa espécie, em condições climáticas favoráveis, pode nidificar durante o ano inteiro, constituindo importante espécie para ser manejada como polinizadora de culturas agrícolas. Seria de grande importância novos estudos similares e também uma extensão do acompanhamento dessa população de *Centris analis* do campus da USP de Ribeirão Preto, para confirmar realmente a constância nos padrões de nidificação observados; certamente, será de grande relevância que se faça esse tipo de acompanhamento com outras espécies de *Centris* e também de outros gêneros de espécies nativas que apresentem grande potencial de polinização, para que se conheçam melhores formas de manejá-las para esse fim.

Os estudos genéticos permitiram confirmar pressuposições quanto à formação de ninhos em *Centris tarsata*, mas o mesmo não foi possível com ninhos de *Centris analis* e, por isso, é de grande importância o desenvolvimento de primers de microssatélites específicos, para incrementar o estudo sociogenético intranidal dessa espécie. Além da possibilidade de utilização desse marcador genético em estudos relacionados à ocupação de áreas e dispersão. Assuntos importantes quando se tratam das *Centris*, espécies visadas para serem substitutas de espécies exóticas na polinização de culturas no Brasil, ressaltando o resultado que encontramos em Ribeirão Preto - a colonização da área por um número reduzido de fêmeas fundadoras - e também para a conservação dessas espécies e dos ecossistemas a que pertencem. O estudo do DNA mitocondrial de *Centris analis* e *Centris tarsata* é igualmente outro tópico de estudo que deve ser foco de mais estudos e, para tal, são necessárias amostras de várias localidades da área de distribuição e também técnicas mais eficientes de extração de DNA de amostras de



insetos conservados em museus, pois essa foi uma das dificuldades encontradas no desenvolvimento de trabalho.

## 7. Referências Bibliográficas

- AGUIAR AJC & MARTINS CF 2002, Paraíba Abelhas e vespas solitárias em ninhos-armadilhas na Reserva Biológica Guaribas (Mamanguape, Brasil). *Revista Brasileira de Zoologia* 19 (Supl. 1): 101-116.
- AGUIAR CML 2003 Utilização de recursos florais por abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em uma área de Caatinga (Itatim, Bahia, Brasil). *Revista Brasileira de Zoologia* 20(3): 457-467
- AGUIAR CML & GARÓFALO CA 2004 Nesting biology of *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith (Hymenoptera, Apidae, Centridini). *Revista Brasileira de Zoologia* 21(3): 477-486.
- AGUIAR CML, ZANELLA CV, MARTINS CF & CARVALHO CAL 2003 Plantas visitadas por *Centris spp.* (Hymenoptera: Apidae) na caatinga para obtenção de recursos florais. *Neotropical Entomology* 32(2): 247-259.
- ALONSO JDS 2008 Efeitos da variação no comprimento dos ninhos-armadilha na biologia de nidificação de *Centris (Heterocentris) analis* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera, Apidae: Centridini). *Dissertação de Mestrado. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto -USP.*96p
- ALVES-DOS-SANTOS I, MELO GAR & ROZEN JG 2002 Biology and immature stages of the bee Tribe Tetrapediini (Hymenoptera: Apidae). *American Museum Novitates* 3777:1-45.
- BIANCHIN I, KOLLER WW & DETMANN E 2006 Sazonalidade de *Haematobia irritans* no Brasil Central. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 26(2): 79-86, abr./jun
- BOSCH, J & VICENS N 2006. Relationship between body size, provisioning rate, longevity and reproductive success in females of the solitary bee *Osmia cornuta*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60: 26-33.
- BROTHERS DJ 1999 Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zoologica Scripta* 28: 233-249.
- BUCHMANN SL 1983 Buzz pollination in angiosperms. In: Jones CE & Little RJ (eds.) *Handbook of Experimental Pollination Biology*, p. 73-114.

- CAMERON SA & MARDULYN P 2001 Multiple molecular data sets suggest independent origins of highly eusocial behavior in bees (Hymenoptera: Apinae). *Systematic Biology* 50(2): 194–214
- CAMILLO E, GARÓFALO CA, SERRANO JC & MUCCILLO G 1995 Diversidade e abundância sazonal de abelhas e vespas solitárias em ninhos armadilhas (Hymenoptera, Apocrita, Aculeata). *Revista Brasileira de Entomologia* 39 (2): 459-470.
- CANE JH 2001 Habitat fragmentation and native bees: a premature verdict? *Conservation Ecology* 5: 1-9
- CEPAGRI - Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura  
-<http://www.cpa.unicamp.br/index.html>
- COUTO RM & CAMILLO E 2007 Influência da temperatura na mortalidade de imaturos de *Centris (Heterocentris) analis* (Hymenoptera, Apidae, Centridini). *Iheringia. Série Zoológica* 97(1): 51-55,
- COVILLE RE, FRANKIE GW & VINSON SB 1983 Nests of *Centris segregata* (Hymenoptera: Anthophoridae) with a review of the nesting habits of the genus. *Journal of the Kansas Entomological Society* 56:109-122.
- CRANE PR, FRIIS EM, PEDERSEN KR 1995 The origin and early diversification of Angiosperms. *Nature* 374: 27-33.
- CRESPI BJ 1991 Heterozygosity in the haplodiploid Thysanoptera. *Evolution* 45:458–464.
- CROSS EA, STITH MG & BAUMAN TR 1975 Bionomics of the organpipe mud-dauber, *Trypoxylon politum* (Hymenoptera: Sphecoidea). *Annals of the Entomological Society of America* 68: 901-916.
- CROZIER RH 1971 Heterozygosity and sex determination in haplodiploids. *American Naturalist* 105:399–412.
- DÓREA MC, SANTOS FAR, LIMA LCL & FIGUEROA L 2009 Análise polínica do resíduo pós-emergência de ninhos de *Centris tarsata* Smith (Hymenoptera: Apidae, Centridini). *Neotropical Entomology*, 38(2): 197-202

- ELLIS JS, KNIGHT ME, CARVELL C & GOULSON D 2006 Cryptic species identification: a simple diagnostic tool for discriminating between two problematic bumblebee species. *Molecular Ecology Notes* 6: 540-542.
- ESTOUP A, SOLIGNAC M, HARRY M & CORNUET JM 1993 Characterization of (GT)<sub>n</sub> and (CT)<sub>n</sub> microsatellites in 2 insect species - *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*, 21:1427-1431.
- FISHER RA 1930 *The genetical theory of natural selection*. Clarendon Press, Oxford, 230p.
- FRANKEL OH & SOULÉ ME 1981 Conservation and Evolution. Cambridge University Press, Cambridge. 366p.
- FRANKIE GW, VINSON SB, NEWSTROM L & BARTHELL JF 1988 Nest site and habitat preferences of *Centris* bees in the Costa Rican dry forest. *Biotropica* 20(4): 301-310.
- FREITAS BM, ALVES JE, BRANDÃO GF & ARAÚJO ZB 1999 Pollination requirements of West Indian cherry (*Malpighia emargiata*) and its putative pollinators, *Centris* bees, in NE Brazil. *Journal of Agricultural Science* 133: 303-311.
- FREEMAN BE, JAYASINGH DB 1975 Factors controlling the distribution in Jamaica of *Pachodynerus nasidens* (Latr.) (Hymenoptera: Eumenidae). *Biological Journal of Linnean Society* 7: 231-241.
- GARÓFALO CA 2000 Comunidade de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) que utilizam ninhos-armadilha em fragmentos de matas do Estado de São Paulo. Anais do Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto, SP, 4: 121-128.
- GARÓFALO CA, MARTINS CF & ALVES-DOS-SANTOS I 2004 The Brazilian solitary bee species caught in trap nests. In: *Solitary bees: Conservation, Rearing and Management for Pollination*, Freitas BM & Pereira JOP (eds.). Imprensa Universitária UFC, Fortaleza, p. 77-84.
- GILLESPIE RG & RODERICK GK 2002 Arthropods on Islands: colonization, Speciation and Conservation. *Annual Review of Entomology* 47: 595–632
- GILLOTT C. 2005 Entomology Third edition Springer.831p
- GOULET HS & HUBER ST 1993 Hymenoptera of the world: An identification guide to families. *Centre Canada. Research Branch*, 668p.

- GREEN CL, FRANCK P & OLDROYD BP 2001 Characterization of microsatellite loci for *Trigona carbonaria*, a stingless bee endemic to Australia. *Molecular Ecology Notes* 1: 89-92
- GRIMALDI D & ENGEL M S 2005 Evolution of the insects. *Cambridge University Press*, 755p.
- GULLAN PJ & CRANSTON PS 2005 The Insects An Outline of Entomology *Third Edition* Blackwell Publishing Ltd 510p.
- HASSELMANN M & BEYE M 2004 Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 4888-4893.
- HOEHN P, TSCHARNTKE T, TYLIANAKIS J M & STEFFAN-DEWENTER I 2008 Functional group diversity of bee pollinators increases crop yield. *Proceedings of the Royal Society London B* 275: 2283–2291.
- HOLT RD 1977 Community modules. In: GANGE, A.C.; BROWN V.K. (Eds.). *Multitrophic interactions in terrestrial systems*. Oxford: Blackwell Science, p. 333–349.
- IMPERATRIZ-FONSECA, VL & DIAS BFS 2004 Brazilian Pollinators Initiative. In: Freitas BM e Pereira OP. *Solitary bees- conservation, rearing and management for pollination*. UFC. p. 27-34.
- JAYASINGH DB & FREEMAN BE 1980 The comparative population dynamics of eight solitary bees and wasps (Aculeata; Apocrita; Hymenoptera) trapnetted in Jamaica. *Biotropica* 12(3): 214-219.
- JESUS BMV & GARÓFALO CA 2000 Nesting behaviour of *Centris (Heterocentris) annalis* (Fabricius) in southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae, Centridini). *Apidologie* 31: 503-515

- KLEIN AM, VAISSIÈRE B E, CANE J H, STEFFAN-DEWENTER I, CUNNINGHAM SA, KREMEN C & TSCHARNTKE T 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society Lond.* B 274: 303-313.
- KLEIN AM, STEFFAN-DEWENTER I & TSCHARNTKE T 2003 Pollination of *Coffea canephora* in relation to local and regional agroforestry management. *Journal of Applied Ecology* 40: 837-845.
- KURTA, A AND TERAMINO, J A 1992 Bat community structure in an urban park - *Ecography* 15 257-261.
- MADEIRA-DA-SILVA MC & MARTINS CF 2006 Comunidades de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) de ninhos-armadilha em áreas de manguezal e restinga na área de proteção ambiental da barra do rio Mamanguape, Paraíba, Brasil. *Anais do Encontro sobre Abelhas* 6: 7-14.
- MENDES FN & RÊGO MMC 2007 Nidificação de *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith (Hymenoptera, Apidae, Centridini) em ninhos-armadilha no Nordeste do Maranhão, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 51: 382-388.
- MICHENER CD 2000 The bees of the world. Baltimore, *The Johns Hopkins University Press*, 913p.
- MORATO E, GARCIA MVB & CAMPOS LAO 1999 Biologia de *Centris* Fabricius (Hymenoptera, Anthophoridae, Centridini) em matas contínuas e fragmentos na Amazônia Central. *Revista Brasileira de Zoologia* 16(4): 1213-1222.
- MORATO EF & CAMPOS LAO 2000 Efeitos da fragmentação florestal sobre abelhas e vespas solitárias em uma área da Amazônia Central. *Revista Brasileira de Zoologia* 17: 4290444.
- MOURE JS, MELO GAR & VIVALLO F 2008 Centridini Cockerell & Cockerell, 1901. In Moure JS, Urban D & Melo GAR (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version*. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>.

- NIEMELLÄ J 1999 Is there a need for a theory of urban ecology? *Urban Ecosystems* 3: 57-65.
- OLIVEIRA R & SCHLINDWEIN C. 2009. Searching for a manageable pollinator for acerola orchards: the solitary oil collecting bee *Centris analis* (Hymenoptera: Apidae: Centridini). *Annals of the Entomological Society of America* 102: 20-273.
- OLIVEIRA MD & SCHLINDWEIN C 2003 Espécies de *Centris* e *Epicharis* (Apidae, Centridini) como polinizadores de *Malpighia emarginata* (acerola - Malpighiaceae) na Zona da Mata em Pernambuco. In: *Anais do VI Congresso de Ecologia do Brasil*. Editora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p. 224-225.
- OWEN RE 1985 Difficulties with the interpretation of patterns of genetic variation in the eusocial Hymenoptera. *Evolution* 39: 201–205.
- PAMILO P & CROZIER RH 1981 Genetic variation in male haploids under deterministic selection. *Genetics* 98: 199–214.
- PARKER FD 1986 Nesting, associates, and mortality of *Osmia sanrafaelae* Parker. *Journal of the Kansas Entomological Society* 59: 367-377.
- PAXTON RJ, WEIBSCHUH N & QUEZADA-EUÁN JJG 1999 Characterization of dinucleotide microsatellite loci for stingless bees. *Molecular Ecology* 8: 685-702
- PEREIRA M, GARÓFALO CA, CAMILLO E & SERRANO JC 1999 Nesting biology of *Centris (Hemisiella) vittata* Lepeletier in southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae, Centridini). *Apidologie* 30: 327-338.
- PETERS JM, QUELLER DC, FONSECA VLI, STRASSMANN JE 1998. Microsatellite loci for stingless bees. *Molecular Ecology* 7: 783-792
- POINAR GO, DANFORTH BN 2006 A fossil bee from Early Cretaceous Burmese amber. *Science* 314: 614-614.

- RESH, V. H. & CARDÉ, R. T. (Eds.). Encyclopedia of insects. Amsterdam: Academic Press, 2003, 1266p.
- ROUBIK DW 1989 *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge University Press, New York.
- ROUBIK DW 2001 Ups and downs in pollinator populations: when is there a decline? *Conservation Ecology* 5: 1-11.
- RUST RW 1998 The effects of cavity diameter and length on the nesting biology of *Osmia lignaria propinqua* Cresson (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of Hymenopteran Research* 7: 84-93.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Ed. New York: Cold Spring Laboratory, 9.16-9.23.
- SCHLINDWEIN C 2000 A importância de abelhas especializadas na polinização de plantas nativas e conservação do meio ambiente. *Anais do Encontro sobre Abelhas* 4: 131-141.
- SCHNEIDER S, ROESSLI D & EXCOFFIER L 2000 *Arlequin 2000: A software for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- SILVA CI, AUGUSTO SC, SOFIA SH & MOSCHETA IS 2007 Diversidade de abelhas em *Tecoma stans* (L.) Kunth (Bignoniácea): A importância na polinização e produção de frutos. *Neotropical Entomology* 36(3): 331-341.
- SILVA FO, VIANA BF & NEVES EL 2001 Biologia e arquitetura de ninhos de *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith (Hymenoptera: Apidae: Centridini). *Neotropical Entomology* 30: 541-545.
- SILVEIRA FA, MELO GAR & ALMEIDA EAB 2002 *Abelhas Brasileiras, Sistemática e Identificação*. Belo Horizonte, 253 p.



- SIMON CF, BECKENBACH A, CRESPI B, LIU H & FLOOK P 1994 Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651–701.
- SOLINAC M, VAUTRIN D, BAUDRY E, MOUGEL F, LOISEAU A & CORNUET JM 2004. A microsatellite based linkage map of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Genetics* 167: 253-262.
- SOUZA R.O, *et al.* 2007 Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera:Apidae). *Molecular Ecology Notes* 6: 1352-1356.
- STEEL RGD, TORRIE JH & DICKEY DA 1997 *Principles and Procedures of Statistics. A biometrical approach.* 3rd ed. McGraw Hill, New York.666p.
- STEFFAN-DEWENTER I 2002 Landscape context affects trap-nesting bees, wasps, and their natural enemies. *Ecological Entomology* 27: 631-637.
- STEINER KE & WHITEHEAD VB 1988 The association between oil-producing flowers and oil-collecting bees in the Drakensberg of Southern Africa. *Monographies on Systematic Botany of the Missouri Botany Garden* 25: 259-277.
- SWOFFORD DL 1999 *PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony 4.0b (\*and Other Methods).* Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- TEPEDINO VJ & FROHLICH DR 1982 Mortality factors, pollen utilization, and sex ratio in *Megachile pugnata* Say (Hymenoptera: Megachilidae), a candidate for commercial sunflower pollination. *Journal of New York Entomological Society* 90: 269-274.
- TEPEDINO VJ & PARKER FD 1983 Nest size, mortality and sex ratio in *Osmia marginata* Michener. *Southwest Entomology* 8(3): 154-167.
- THOMSON JD, GIBONS TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F & HIGGINS DG 1997 The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.

- TORCHIO PF & TEPEDINO VJ 1980 Sex ratio, body size and seasonality in a solitary bee, *Osmia lignaria propinqua* Cresson (Hymenoptera: Megachilidae). *Evolution* 34: 993-1003.
- TSCHARNTKE T, GATHMANN A & STEFFEN-DEWENTER I 1998 Bioindication using trap-nesting bees and wasps and their natural enemies: community structure and interactions. *Journal of Applied Ecology* 35: 708-719.
- VANDEWOESTIJNE S, MARTIN T, LIÉGEOIS S & BAGUETTE M 2004 Dispersal, landscape occupancy and population structure in the butterfly *Melanargia galathea*. *Basic and Applied Ecology* 5: 581-591.
- VANDEWOESTIJNE S & BAGUETTE M 2004 Demographic versus genetic dispersal measures. *Population Ecology* 46: 281–285.
- VIANA BF, SILVA FO & KLEINERT AMP 2001 Diversidade e sazonalidade de abelhas solitárias (Hymenoptera: Apoidea) em dunas litorâneas no Nordeste do Brasil. *Neotropical Entomology* 30: 245-251.
- VOGEL S & MACHADO ICS 1991 Pollination of four sympatric species of *Angelonia* (Scrophulariaceae) by oil-collecting bees in NE, Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 178: 153-178.
- WILGENBURG E, DRIESSEN G & BEUKEBOOM LW 2006. Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an "unintelligent" design? *Frontiers in Zoology* 3:1
- YEH FC, YANG R & BOYLE T 2000 PopGene version 3.2: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. Edmomy: University of Alberta,2000. Disponível em: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm>

## 8. Anexos

**Anexo 1.** Descrição das famílias (ninhos) e seus fenótipos para os locos enzimáticos que apresentaram variação.

Famílias	Amostra	Sexo	est-4	Sistemas Enzimáticos					Formação do ninho
				Est-3	ICD	6-GPD*	ME	Hbdh	
<b>Família 1</b>	1492.1	Macho			F	F			<b>Monoginia/Monoandria</b>
	1492.7	Fêmea			F	F			
	1492.8	Fêmea			FS	F			
	1492.2	Macho			F	S			
	1492.3	Macho			F	F			
	1492.4	Macho			F	S			
	1492.5	Macho			S	S			
	1492.6	Macho			S	S			
<b>Família 2</b>	1511.1	Macho			S	F	F		<b>Monoginia/Monoandria</b>
	1511.3	Fêmea			FS	F	FS		
	1511.4	Fêmea			FS	F	FS		
	1511.2	Macho		F	F	S	S		
	1511.5	Fêmea		FM	FS	FS	FS		
	1511.6	Fêmea		FM	FS	FS	FS		
<b>Família 3</b>	1513.1	Fêmea						FM	<b>Monoginia/Monoandria</b>
	1513.2	Fêmea						FM	
	1513.3	Fêmea						FM	
<b>Família 4</b>	1516.1	Macho	F			F		M	
	1516.2	Fêmea	FS			F		M	
	1516.3	Fêmea	FS	*****		F		M	
	1516.4	Macho	F	F		S		M	
	1516.5	Fêmea	FS	F		S		FM	
	1516.6	Fêmea	FS	F		S		M	
	1516.7	Fêmea	FS	F		S		M	



	1808.4	Fêmea			F				
	1808.5	Fêmea			F				
<b>Família 11</b>	1804.1	Macho				F			<b>Monoginia/Monoandria</b>
	1804.2	Fêmea				FS			
	1804.3	Fêmea				FS			
	1804.4	Macho				S			
	1804.5	Macho				S			

Espaços vazios indicam que o fenótipo desses indivíduos é constituído da variante mais comum.

Família 4 não pode ser explicada por monoandria/monoginia.

## **Anexo 2 –**

Dados de temperatura e pluviosidade de Ribeirão Preto, obtidos através do site do CEPAGRI

<b>TEMPERATURA PLUVIOSIDADE</b>		
Janeiro	25	265
Fevereiro	25	206,8
Março	25	156,6
Abril	23	69,1
Maio	21	47,8
Junho	20	28,6
Julho	20	20,9
Agosto	22	21
Setembro	23	51,9
Outubro	25	128,8
Novembro	24	168,5
Dezembro	25	257,5

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)