

**Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Sistemática e Ecologia**

Airton Torres Carvalho

**Interações entre *Protodiscelis* (Colletidae,
Neopasiphaeinae) e plantas aquáticas e a
importância de odores florais na atração de
polinizadores**

João Pessoa, 2012

Airton Torres Carvalho

Interações entre *Protodiscelis* (Colletidae, Neopasiphaeinae) e plantas aquáticas e a importância de odores florais na atração de polinizadores

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Ciências Biológicas – Zoologia da Universidade
Federal da Paraíba como requisito para obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas

Aluno: Airton Torres Carvalho

Orientador: Clemens Schlindwein

Co-orientador: Celso Feitosa Martins

**João Pessoa
2012**

C331i Carvalho, Airton Torres.
Interações entre *Protodiscelis* (Colletidae, Neopasiphaeinae) e plantas aquáticas e a importância de odores florais na atração de polinizadores / Airton Torres Carvalho.-- João Pessoa, 2012. 130f. : il.
Orientador: Clemens Schlindwein
Co-orientador: Celso Feitosa Martins
Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN
1. Zoologia. 2. Abelhas oligoléticas. 3. Oligoletia. 4. Atributos florais. 5. Pistas florais. 6. Polinização.

UFPB/BC

CDU: 59(043)

Airton Torres Carvalho

Tese de doutorado intitulada

“Interações entre *Protodiscelis* (Colletidae, Neopasiphaeinae) e plantas aquáticas e a importância de odores florais na atração de polinizadores”

BANCA EXAMINADORA

Dr. Cledes Schlindwein – UFMG (Orientador)

Dr. Michael Hrnčíř – UFRSA

Dr. Fernando Cesar Vieira Zanella- UFCG

Dr. Antonio Christian de Andrade Moura - UFPB

Dr. Bráulio Almeida – UFPB

Dr. Paulo Milet Pinheiro – UFPE (1º Suplente)

Dra. Denise Cruz – UFPB (2º Suplente)

João Pessoa

Maio de 2012

Dedico essa tese ao meu avô materno
Cleantho da Câmara Torres e ao meu avô
paterno *Ayrton de Almeida Costa Carvalho* (*in*
memoriam) que tanto contribuíram para
formação intelectual no Brasil.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meu orientador **Clemens Schlindwein** por todos os momentos de construção de ideias e proveitosa amizade construída ao longo de mais de 10 anos. Obrigado por me repassar um pouco de seu conhecimento. Esse sim merece ser agradecido por tudo.

A **Reisla Oliveira** por todos os momentos de construção científica, bem como pela amizade, compreensão e carinho que tem por mim. Minha amiga de todas as horas a muito tempo. Agradeço a ela e ao Clemens por ter, além de ter gerado uma criaturinha muito levada, me proporcionaram tempos de alegria e brincadeira com o **Ian Schlindwein**, em momentos que foram muito duros para mim durante esses quase quatro anos.

Aos meus pais **Maria de Fátima Peregrino Torres** e **Rodrigo Otávio Costa Carvalho** pelo apoio e amor incondicional. Escrever sobre a importância dos meus pais aqui, não seria possível, uma vez que foram fundamentais pela formação de minha personalidade e pelo “gosto” pela ciência.

As minhas irmãs **Mariana** e **Manuela Torres Carvalho**, **Nice Lima** e também a Dada “minha preta” (**Darci Maria de Oliveira**) pessoas que sempre estiveram ao meu lado. A duas figurinhas que nos enchem de alegria **Vinícius** e **Artur Carvalho Carneiro** e meu cunhado **Warlindo Carneiro** por momentos felizes em São Paulo.

Aos pesquisadores amigos que sempre estiveram junto a mim durante o desenvolvimento desse trabalho: **Paulo Milet Pinheiro**, **Artur Campos D. Maia**, **Poliana Ojima**, **Adaauto Alex dos Santos**, **Carlos Eduardo Pinto da Silva** e **Carlos Eduardo Nobre**. Pessoas importantíssimas pessoalmente e profissionalmente.

Agradeço imensamente a **Stefan Dötterl**, pesquisador que me recebeu de braços abertos no período que permaneci em Bayreuth, Alemanha. Amigo e parceiro científico para sempre.

A **Celso Martins** professor e amigo que foi de suma importância nessa caminhada.

A **Eduardo Almeida** pelas boas discussões quanto a taxonomia de *Protodiscelis* e grande importância na primeira versão do projeto de pesquisa.

Aos membros da minha banca de qualificação **Betina Blochtein** e **Fernando Zanella** que deram importantes contribuições nas versões iniciais dos manuscritos.

Agradeço também aos outros membros do grupo de pesquisa Plebeia **Maise Silva**, **Milson Batista**, **Davi Jamelli**, **Hans Santos**, **Diana Penante** e **Juliana Pereira**, pelos momentos e discussões no laboratório Plebeia em Recife, num período no qual fui muito exigido como profissional.

A Dona **Graça** e Seu **Airton Oliveira** pessoas que me acolheram de forma inexplicável em vários momentos. Sou imensamente grato aos seus ensinamentos amigos!

Aos amigos que me receberam tão bem em Bayreuth: **Irmgard Schaeffler** seu marido **Till** que tornaram minha estada em solo estrangeiro um pouco menos traumática! Agradeço também a todos os participantes do grupo de pesquisa em ecologia química da Uni Bayreuth e aos alunos que participaram do “curso de polinização e ecologia química”.

A todas as pessoas que me ajudaram em trabalhos de campo, especialmente **Antônio de Brito Tenório, Adjane Silva, Telton Ramos, Paula Honório, Robson Ramos, Gabriel Mendes, Davi Jamelli, Antônio Bernardino, Lucas Viegas, Hans Santos, Camila Vidotto e João da Silva.**

A meu tio de coração **Antônio de Brito Tenório** e seu primo **Leniro Tenório Vaz** que me autorizaram a trabalhar em suas terras em Pedra-PE.

Bruno Benzina, Diogo Suíno e Ivy Rocha pela amizade e estadia na França e Espanha. **Michael Schessl e Rosa Batateira** pelos bons momentos em Frankfurt. **Frida Mesel e Felipe Lira** pela estadia em Madrid. Amigos que abriram minha mente para o mundo. Muito obrigado.

Aos meus amigos **Diogo Chiaradia e Bruno Paes** (mais do que irmãos) pela amizade de mais de 20 anos e apoio sempre nas horas mais ingratas. Outros amigos antigos e não menos importantes **Natália Santoro e Bruno Nunes** sempre prontificados a uma bebedeira nos momentos alegres e difíceis.

A **Ricardo Abadie Guedes e Francisco de Oliveira Marques Cariri** meus grande amigos de UFPE. Irmãos.

Aos “científicos”: **Paulo Sávio, Gabriela Bieber, Severino Rodrigo, Felipe Melo, Adriane Mendes, Bruno Paes, Telton Ramos, Gustavo Toledo, Bruno Campos, Flavia Moura, Paula Honório, Robson Ramos, Carolina Liberal, Virginia Araújo, Helder Araújo, Augusto Santiago, José Roberto Botelho, Waleska Gusmão, Francisco O. M. Cariri, Ricardo A. Guedes, Leonardo Pierrot, Manuela P. Barreto, Rodrigo Torres, Raissa Sarmento, e Lucas Viegas.**

A todos os alunos, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas Zoologia da UFPB.

Pessoas que fizeram parte da minha vida nesse período de doutorado e merecem ser lembradas com carinho: **Adriane, Gabriel, Thiago, Vanilda, Waldete, Valmira Mendes e Ricardo.** Linda família que sempre me deram grande apoio.

Aos meus tios **Régis Cavalcante, Maria Tereza P. Torres** e meu primo **Régis Filho** que me receberam de braços abertos em sua casa em João Pessoa.

Ao Cnpq pela bolsa.

Ao IBAMA e ao ICMBio pelas licenças de coleta.

RESUMO

CARVALHO, AT. 2012. **Interações entre *Protodiscelis* (Colletidae, Neopasiphaeinae) e plantas aquáticas e a importância de odores florais na atração de polinizadores.** 130p Tese de doutorado. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas área de concentração Zoologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

Abelhas são os principais polinizadores das plantas com flores. Plantas são sésseis e a reprodução sexuada cruzada somente ocorre através de vetores de pólen. Sendo assim, flores zoofílicas provêm pistas para o encontro interespecífico, são polinizadas e fornecem recursos florais aos polinizadores. O principal recurso coletado por abelhas – “herbívoros Apiformes” – é pólen, o principal alimento larval. Para as plantas, entretanto, existe um balanço entre recurso fornecido e quantidade de grãos de pólen efetivamente transportados para os estigmas. Esse balanço é regido por variáveis, entre elas a atratividade ao polinizador, a sua efetividade na polinização, a quantidade de pólen exportado e recebido e a quantidade de energia dispensada no processo reprodutivo. Considerando que flores apresentam atributos específicos para determinados grupos de polinizadores (síndromes florais), houve uma tendência entre os estudiosos da polinização de avaliar a evolução de flores como dirigida à especialização. Entretanto, a especialização é relativa ao grupo observado e se comporta dentro de um *continuum* entre amplamente generalista e altamente especialista. Estudei dois grupos de abelhas, um que apresenta especialização em pólen e outro generalista em relação aos recursos polínicos, mas ocupando um nicho raro entre abelhas, o hábito noturno.

Estudei abelhas especializadas de *Protodiscelis* (Colletidae, Neopasiphaeinae) e sua interação com flores. *Protodiscelis* é um grupo de abelhas oligoléticas, ou seja coletam grãos de pólen para as larvas em flores do mesmo gênero ou família. As fêmeas coletam grãos de pólen exclusivamente em flores de Alismataceae, grupo formado por espécies aquáticas comuns a ambientes lênticos. Foi estudada a polinização de quatro espécies dessa família procurando entender a interação no âmbito espacial, morfofuncional e das pistas florais usadas pelas abelhas para encontrar as flores das quais dependem. Dividi os resultados obtidos em três manuscritos, cada um tratando de um dos temas analisados.

A polinização de *Echinodorus palaefolius* foi estudada em vários alagados da caatinga. Adicionalmente, verifiquei as relações entre abelhas e flores de cinco outras espécies do mesmo gênero (*E. subalatus*, *E. glandulosus*, *E. paniculatus*, *E. pubescens* e *Echinodorus* sp.). *Echinodorus palaefolius* é autoincompatível e depende de polinizadores para a formação de frutos. Sua fenologia foi regida pelas chuvas e suas flores foram visitadas somente por três espécies de abelhas: *Protodiscelis alismatis*, *Apis mellifera* e *Trigona spinipes*. Surpreendentemente, as flores morfológicamente generalistas dessa espécie de planta, são visitadas por uma espécie oligolética (*P. alismatis*) e por duas das espécies de abelhas entre as mais generalistas conhecidas (*A. mellifera* e *T. spinipes*). A espécie oligolética, no entanto, foi responsável por mais de 80% das visitas às flores. Essa espécie de abelha tem comportamento e adaptações morfológicas claras, tais como pelos extremamente plumosos capazes de coletar os grãos de pólen pequenos de *Echinodorus*. Foram presentes em 96% dos 41 alagados que amostréi na caatinga. Abelhas de *P. alismatis* também foram os principais polinizadores das outras espécies de *Echinodorus* coletadas ao longo de mais de 1000 km da distribuição natural da caatinga. A relação especializada dessa espécie com suas plantas hospedeiras é muito consistente no ambiente insular na caatinga onde essas plantas aquáticas ocorrem.

A polinização de *Limnocharis flava*, *L. laforestii* e *Hydrocleys nymphoides*, espécies do clado neotropical limnocharitaceas da família Alismataceae em várias populações no nordeste e centro-oeste brasileiro foram estudadas. Os resultados foram comparados com as características da associação entre *H. martii* e *Protodiscelis palpalis*, estudada anteriormente.

Analisei os atributos morfológicos e o sistema reprodutivo que diferenciam essas espécies. As três espécies foram visitadas por *Protodiscelis palpalis*, mesma espécie oligolética e único polinizador efetivo de *H. martii*. Flores de *L. flava* foram morfo-funcionalmente semelhantes às de *H. martii*. Nessas duas espécies a presença de estaminódios protege o pólen e somente *P. palpalis*, que apresenta comportamento adaptado para acessar a câmara de pólen, polinizou efetivamente as flores. Já nas flores de *L. laforestii* apesar da presença de estaminódios, abelhas de outras espécies polinizam as flores. Na população de Serra Negra do Norte, *P. palpalis* foi substituída por outra espécie de *Protodiscelis* ainda não descrita. Em *Limnocharis*, entretanto, não há necessidade de visitas para a formação de frutos. As duas espécies formaram sementes em grande quantidade por autogamia. As flores de *H. nymphoides* são maiores e os estaminódios mais curtos. Essa espécie autoincompatível é polinizada por várias espécies de abelhas generalistas principalmente sociais de *T. spinipes*, *A. mellifera* e *Bombus brevivillus* (Apidae). Visto que autogamia é uma das principais variáveis para estabelecimento e disseminação de plantas em invasões biológicas (Lei de Baker), a ocorrência desse tipo de polinização talvez possa explicar a condição de invasoras (na Ásia, Oceania e América do Norte) das três espécies estudadas. A relação generalista com polinizadores explicaria as invasões observadas para *H. nymphoides*.

Utilizei as técnicas de *headspace* dinâmico e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) para descrever os voláteis florais produzidos pelas flores de *H. martii* e *H. nymphoides*. Testei a atratividade dos principais compostos às abelhas de *Protodiscelis palpalis* em campo. Odores florais na família Alismataceae foram descritos pela primeira vez. As flores de *H. martii* produziram 22 compostos e *H. nymphoides* 13. Cada espécie, apesar de vários compostos em comum, tem seu perfil de odores característico. Benzenóides metoxilados foram os principais componentes dos buquês. *p*-metilanisol foi dominante em *H. martii* e 3,4-dimetoxitolueno em *H. nymphoides*. Os compostos florais *p*-metilanisol, 2-metoxi-4-metilfenol, 3,4-dimetoxitolueno, 3,4,5-trimetoxitolueno e salicilato de metila foram testados no campo em flores artificiais construídas com fita adesiva amarela e azul. Somente *p*-metilanisol atraiu significativamente mais abelhas às flores artificiais das duas cores comparadas com as de controle. Flores amarelas atraíram proporcionalmente mais abelhas que azuis. Os nossos resultados, obtidos pela primeira vez para abelhas oligoléticas neotropicais e em ambiente natural, mostram que um único composto volátil atrai fêmeas de *P. palpalis* demonstrando que é o canal de comunicação mais importante entre *P. palpalis* e as flores de *H. martii* e *H. nymphoides*. Nossos resultados reforçam que os compostos voláteis específicos do buquê de flores são cruciais para a localização de plantas hospedeiras pelas abelhas oligoléticas.

Abelhas de *Megalopta* (Halictidae, Augochlorini) são noturnas e exploram um nicho inacessível às outras abelhas. Nessa interação estudei os odores como sinal floral fornecido pelas flores. Odores há muito são conhecidos como atrativo de polinizadores, entretanto, pouco se sabe em relação à identidade dos compostos produzidos e que estimulam respostas comportamentais, tais como atração nos polinizadores. Selecionei odores comuns a buquês florais de plantas e os testei no campo na atratividade de abelhas *Megalopta*. Testei a hipótese de que odores florais comuns, amplamente produzidos por flores de antese noturna, seriam capazes de atrair abelhas de *Megalopta*. Encontrei que compostos aromáticos isolados foram capazes de atrair essas abelhas e eliciaram um comportamento de visita. As abelhas foram significativamente mais atraídas às armadilhas com acetato de benzila, benzoato de benzila e salicilato de metila como iscas do que outros compostos menos comuns em flores de antese noturna. Abelhas de *Megalopta*, dessa maneira, usam odores para encontrar flores nas condições de baixa luminosidade, tal como vários outros grupos de polinizadores noturnos.

Palavras-chave: abelhas oligoléticas; oligoletia; atributos florais; pistas florais; voláteis; odores; interações especializadas; Alismataceae; Limnocharitaceae; polinização

Abstract

CARVALHO, AT. 2012. **Interactions between bees of *Protodiscelis* (Colletidae, Neopasiphaeinae) and aquatic plants, and the importance of odors to locating flowers.** 2012. 130p PHD thesis. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas área de concentração Zoologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

Bees are the main pollinators in terrestrial environments. Plants are sessile organisms that only attain cross-sexual reproduction through the activity of pollen vectors. As such, flowers offer hints for the interspecific encounter; they obtain pollination services and in exchange, usually, they provide floral resources to pollinators. The main resource sought by bees is pollen, which is used as larval nourishment. From the plants standpoint, however, there must be a balance between the offered resource and the amount of pollen grains effectively transferred to the stigmas. Such balance is dictated by a number of variables; pollinator attractivity, pollinator effectiveness, quantity of pollen exported/received and the energy allotted in the reproductive process. Aware of this paradox and observing that flowers exhibit specific traits associated with certain groups of pollinators (floral syndromes), there has been a tendency among researchers to evaluate flower evolution as if it were directed towards specialization. Nonetheless, specialization is associated to the referential group and behaves within a *continuum* of plain generalization and high specialization. I have studied two groups of bees: one a specialist and the other a generalist, although adapted to a rare niche among bees – the nocturnal habit.

I studied specialized bees of the genus *Protodiscelis* (Colletidae, Neopasiphaeinae), a group that exhibits feeding habit specialization, and their interaction with flowers. *Protodiscelis* bees are oligolectic, meaning that they are genetically determined to collect pollen grains for larval provisioning among phylogenetically constraint plant taxa. These bees will only gather pollen from species of the family Alismataceae, a group comprised of aquatic herbs common to lentic ecosystems. I investigated the pollination of four species belonging to this family and aimed to understand the plant-pollinator interactions within a spatial and morphofunctional frame, which also involves the floral cues used by the bees in order to find they preferred host flowers. I divided the obtained results into three upcoming publications, each dealing with one of the analyzed themes.

The pollination of *Echinodorus palaefolius* was studied in several flooded areas in the Caatinga. Additionally I investigated the relationships between bees and flowers of five other species of the same genus (*E. subalatus*, *E. glandulosus*, *E. paniculatus*, *E. pubescens* e *Echinodorus* sp.). *Echinodorus palaefolius* is self-incompatible and relied on pollinators to develop fruits. The phenology of the species is dictated by the rain regime and flowers were visited by three bee species alone: *Protodiscelis alismatis*, *Apis mellifera* and *Trigona spinipes*. Surprisingly, the morphologically generalist flowers of this plant species are visited by an oligolectic bee (*P. alismatis*) and by the two among the most generalist of bees (*A. mellifera* and *T. spinipes*). The oligolectic species, however, was accounted with over 80% of flower visits. Bees of *P. alismatis* exhibit clear behavioral and morphological adaptations, such as extremely plumose setae that can hold the small pollen grains of *Echinodorus*. They were present in 96% of the 41 flooded areas that I sampled in the Caatinga. Bees of *P. alismatis* were also the main pollinators of the other species of *Echinodorus* collected within over 1,000 km of natural distribution of the Caatinga. The specialized relationship of these bees with their host plants is highly consistent in the insular environments of the Caatinga, where the aquatic Alismataceae naturally occur. The pollination ecology of three species of a neotropical clade limnocharitaceae (Alismataceae) was studied among distinct populations in northeast Brazil and middle-west Brazil. The results of pollination ecology were compared to those of *H. martii*, previously studied. I researched the morphological attributes and the aspects of the reproductive system that differentiate these species. *Limnocharis flava*, *L. laforestii* and *Hydrocleys nymphoides* were all visited by

Protodiscelis palpalis, the same oligolectic species previously recognized as the sole effective pollinator of *H. martii*. Flowers of *L. flava* were found to be morphologically and functionally similar to those of *H. martii*. In both species, the presence of staminodes protect the pollen and bees of *P. palpalis* alone were effective pollinators, due to an adapted behavior that allows them to access the pollen chamber. The flowers of *L. laforestii*, on the other hand, were effectively pollinated by other species of bees, regardless of the presence of staminodes. But in this case, no protective pollen chamber is formed. In the population of the municipality of Serra Negra do Norte, *P. palpalis* was replaced by a yet undescribed species of *Protodiscelis*. For *Limnocharis*, however, animal pollen vectors are not required for fruit development and both studied species yielded high seed counts through autogamy. The flowers of *H. nymphoides* are larger and bear staminodes that do promote filtering of other bee species. Regardless of genetic self-incompatibility, *H. nymphoides* is pollinated by several generalist bee species, notably the social *T. spinipes*, *A. mellifera* and *Bombus brevivilus* (Apidae). Knowing that autogamy is one of the main variables for the establishment and dissemination of plants in biological invasions (Baker's Law), the occurrence of this type of pollination may largely explain the invasive status of the three studied species in Asia, Oceania and North America. The generalist association with pollinators would explain the invasions observed for *H. nymphoides*.

I used the sampling method of dynamic headspace and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) to describe the volatile compounds emitted by the flowers of *H. martii* and *H. nymphoides*. I tested the attractivity of the main isolated compounds to bees of *Protodiscelis palpalis* in field conditions. Floral scents in the family Alismataceae were described for the first time. Flowers of *H. martii* produced a bouquet comprised of 22 compounds, whereas the bouquet of *H. nymphoides* contained 13 compounds. Each species, despite sharing several compounds, present a characteristic floral scent profile. Methoxylated benzenoids were the main constituents of the bouquets of *H. martii* and *H. nymphoides*. *p*-Methylanisole is the main compound in the floral scent of *H. martii* and 3,4-dimethoxytoluene the main compound in *H. nymphoides*. These two compounds, however, were isolated in both species. *p*-methylanisole, 2-methoxy-4-methylphenol, 3,4-dimethoxytoluene, 3,4,5-trimethoxytoluene and methyl salicylate were used in field biotests with artificial flowers assembled from yellow and blue adhesive paper. Only *p*-methylanisole yielded significantly more approaches from bees towards artificial flowers of both colors in comparison to control flowers. Artificial yellow flowers, however, proportionally attracted more bees than blue flowers. Our results, the first ever obtained in a natural environment setting, show that a single volatile compound attracts female *P. palpalis* and is the most important communication channel between these pollinators and flowers of *H. martii* e *H. nymphoides*. Our results reinforce the fact that specific volatile compounds present in flower bouquets might be crucial for the localization of host plants by oligolectic bees.

Bees of *Megalopta* (Halictidae, Augochlorini) are nocturnal and explore a niche that is mostly inaccessible to other bees. In the interaction between *Megalopta* bees and their host plants I studied one of the signals emitted by the flowers: floral scents. Scents have long been known as pollinator attractants, but little is known about the identity of the compounds produced by flowers and which among them incite behavioral responses of animals, such as pollinator attraction. I selected volatile compounds commonly isolated in floral scents and conducted field attraction biotests with *Megalopta* bees. I tackled the hypotheses that such common floral scent compounds, frequently identified in night-blooming angiosperms, would be involved in the attraction of *Megalopta* bees. I found out that single aromatic compounds effectively attracted female bees and elicited visiting behavior. Bees were significantly more attracted to traps baited with benzyl acetate, benzyl benzoate and methyl salicylate than to unbaited traps or traps baited with compounds less frequently isolated in night-blooming flowers (β -ionone, eucalyptol, eugenol and vanillin). I concluded that *Megalopta* bees use scents to find flowers under low-light conditions, as observed by several other groups of

nocturnal pollinators. Moreover, I provided a new sampling technique for these rarely collected insects.

Key words: oligolectic bees; oligolecty; floral traits; floral cues; volatiles; scents; specialized interactions; Alismataceae; Limnocharitaceae; pollination.

Sumário

Dedicatória	II
Agradecimentos	III
Resumo	V
Abstract	VII
Apresentação	XI
1. Fundamentação teórica	14
1.1. A especialização e generalização nos sistemas abelha-planta	14
1.2. Comunicação química entre flores e polinizadores	17
1.3. Como abelhas encontram flores?	18
1.4. Oligoetia e odores florais específicos	19
2. Sobre os grupos estudados	21
2.1. As plantas	21
2.1.1. Alismataceae	22
2.2. As abelhas	25
2.2.1 Tratamento taxonômico de Colletidae Lepeletier, 1841 e <i>Protodielis</i> Brèthes, 1909	25
3. Sobre a atratividade de <i>Megalopta</i> a odores florais	26
3.1. Como encontrar flores à noite?	27
4. Referencias Bibliográficas	28
5. Manuscritos	40
5.1. Abelhas oligoléticas e amplamente poliléticas como polinizadores de <i>Echinodorus</i> (Alismataceae) em alagados temporários da Caatinga, Brasil	41
5.2. Polinização em <i>Limnocharis</i> e <i>Hydrocleys</i> (Alismataceae): reprodução de três espécies potencialmente invasoras	72
5.3. Sozinho, um volátil floral benzenóide atrai o polinizador em uma relação interdependente entre abelha oligolética-planta	103
5.4. Abelhas noturnas são atraídas por odores florais comuns	122

Apresentação

Nessa tese trato de dois temas: 1) Ecologia da polinização em Alismataceae e; 2) Pistas odoríferas atrativas a abelhas.

A família Alismataceae (Alismatales) é composta por plantas aquáticas e tem distribuição cosmopolita. Nos neotrópicos ocorrem cinco gêneros, dos quais espécies de *Echinodorus*, *Hydrocleys* e *Limnocharis* apresentam relações com abelhas oligoléticas do gênero *Protodiscelis* (Colletidae, Neopasiphaeinae) (Carvalho 2008). A oligolectia é um fenômeno surgido independentemente em várias linhagens, em que espécies de abelhas restringem suas fontes de pólen a flores de hospedeiros do mesmo gênero ou família (Cane e Sipes 2006).

A tese é composta por uma fundamentação teórica e quatro manuscritos, um dos quais, já publicado. No primeiro trabalho descrevi a interação entre plantas de *Echinodorus palaefolius*, espécie endêmica da caatinga (Haynes e Holm-Nielsen 1994) que ocorre em alagados efêmeros e que interage com abelhas de *Protodiscelis alismatis*. Nesse manuscrito, além da descrição detalhada da polinização de *E. palaefolius*, foram amostradas abelhas em flores de várias outras espécies de *Echinodorus* da caatinga. Ao contrário do esperado, abelhas de somente três espécies foram frequentemente coletadas nas flores pouco especializadas morfologicamente dessas espécies. Duas das espécies estão entre as mais generalistas, *Apis mellifera* e *Trigona spinipes*, enquanto o principal polinizador foi *P. alismatis*. Aspectos da generalização e especialização em sistemas de polinização foram discutidos.

O segundo manuscrito trata a ecologia da polinização de *Limnocharis flava*, *Limnocharis laforestii* e *Hydrocleys nymphoides*. Nesse trabalho é discutida a importância das características florais, sistema reprodutivo e interação com polinizadores no seu potencial como invasoras. *Hydrocleys martii*, outra espécie do clado limnocharitaceas, que anteriormente foi tratada como Limnocharitaceae (Haynes e Holm-Nielsen 1992, Chen et al. 2012) apresentou relação íntima com abelhas de *Protodiscelis palpalis*, nos mesmos alagados efêmeros de Caatinga em que espécies de *Echinodorus* ocorrem (Carvalho e Schlindwein 2011). *Hydrocleys martii*, embora muito utilizada como ornamental em diversas regiões do mundo, não apresenta nenhum registro como planta invasora ao contrário de *L. flava* e *H. nymphoides*, registradas como invasoras na América do Norte, Ásia e Austrália. Descobrimos que apesar de também serem polinizadas por abelhas de *Protodiscelis* as duas espécies de *Limnocharis* são autogâmicas. Já *H. nymphoides* foi obrigatoriamente xenogâmica sendo polinizada por abelhas poliléticas amplamente distribuídas.

Odores florais são reconhecidos como atraentes de polinizadores desde os primórdios dos estudos de polinização (ver Mayr 1986). Em estudos com abelhas oligoléticas há descrições de que os odores florais seriam pistas importantes para o encontro entre parceiros, embora ainda sejam pouco conhecidas substâncias específicas atraentes desses animais. No terceiro manuscrito descrevi os buquês florais de *H. martii* e *H. nymphoides* e testei em campo a atratividade de *standards* sintéticos das principais substâncias desses buquês. Somente uma das substâncias testadas, p-metilanisol atraiu abelhas de *Protodiscelis*. Discuto a importância desse odor específico e relativamente raro em buquês florais, na interação *Protodiscelis/Hydrocleys* em alagados efêmeros da caatinga.

No quarto manuscrito testei em campo com armadilhas, odores amplamente conhecidos em buquês florais na atração de abelhas noturnas de *Megalopta* (Halictidae, Augochlorini). Ainda não era conhecido como essas abelhas encontravam recursos de pólen sob baixa luminosidade. Compostos aromáticos comuns em plantas com antese noturna atraíram essas abelhas à armadilhas (Carvalho et al. 2012).

Os capítulos foram formatados como manuscritos para publicação em jornais científicos. Foi seguida a formatação sugerida pela revista escolhida, salvo as limitações que o formato de tese impôs. Os manuscritos são versões em língua portuguesa do que será submetido a revistas científicas em língua inglesa. O manuscrito 4 já foi publicado na revista "*Journal of Chemical Ecology*". Apresento uma tradução para o português do referido trabalho.

Literatura citada

Cane JH, Sipes S. 2006. Characterizing Floral Specialization by Bees: Analytical Methods and Revised Lexicon for Oligolecty. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plan-Pollination Interactions: From specialization to Generalization*. Chicago: The University of Chicago Press, 99-121.

Carvalho AT. 2008. *Polinização de Hydrocleys martii (Limnocharitaceae) e sua associação com Protodiscelis palpalis (Colletidae, Paracolletinae)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife 74p.

Carvalho AT, Maia ACD, Ojima PY, Santos AA, Schlindwein C. 2012. Nocturnal bees are attracted by widespread floral scents. *Journal of Chemical Ecology* **38**: 315-318.

Carvalho AT, Schlindwein C. 2011. Obligate association of an oligolectic bee and a seasonal aquatic herb in semi-arid north-eastern Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society* **102**: 355–368.

Chen' L, Chen J, Gituru RW, Temam TD, Wang Q. 2012. Generic phylogeny and historical biogeography of Alismataceae, inferred from multiple DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **63**: 407–416.

Haynes RR, Holm-Nielsen LB. 1992. The Limnocharitaceae. *Flora Neotropica Monographs New York Botanical. Garden. New York* **56**: 1-32.

Haynes RR, Holm-Nielsen LB. 1994. The Alismataceae. *Flora Neotropica Monographs New York Botanical. Garden. New York* **64**: 1-112

Mayr E. 1986. Joseph Gottlieb Kölreuter's contributions to biology. *Osiris* **2**: 135-176

1. Fundamentação teórica

1.1. A especialização e generalização nos sistemas abelha-planta

Plantas com flores são organismos sésseis que necessitam do serviço de polinização para que a reprodução sexuada cruzada ocorra. Entre os mais variados grupos de polinizadores, abelhas são os principais prestadores desse serviço para as angiospermas em quase todos os ecossistemas terrestres (Faegri e Van der Pijl 1979, Neff e Simpson 1992). As abelhas, por outro lado, são insetos herbívoros de pólen, e ao buscar o alimento para o requerimento próprio e para o provisionamento larval, acabam por prestar o serviço.

As interações abelha-planta culminam em um paradoxo que vem intrigando pesquisadores ao longo dos anos. Por um lado, abelhas necessitam do recurso fornecido pelas flores, por outro, as plantas necessitam exportar e importar grãos de pólen. Há, então, nessas interações um balanço fino entre o número de gametófitos doados como recurso e os que efetivamente irão crescer nos estigmas e completar seu ciclo de vida. Esse paradoxo também é válido para toda a miríade de interações polinizadores-plantas, já que na grande maioria dos casos há o fornecimento de um recurso energeticamente caro para os vegetais.

Durante a evolução, flores se adaptaram para que esse balanço seja o mais rentável possível (Harder e Barrett 2006) e, nas abelhas, surgiram adaptações para manipular e coletar eficientemente os recursos (Linsley e MacSwain 1958, Linsley et al. 1964, Thorp 1979). Assim, a partir das observações das intrincadas estruturas morfológicas de algumas flores e da complexidade das interações, postulou-se a hipótese de que a evolução dessas interações tenderia a ser cada vez mais especializada (Aigner 2004). Essa tendência no pensamento científico deve-se muito a interpretação de Darwin (1862) sobre a seleção direcional dos esporões florais em *Angraecum sesquipedale* (Orchidaceae), da ideia de síndromes florais (Delpino 1868, Müller 1873, Vogel 1954, Faegri e van der Pijl 1979) e de que a evolução das flores seria direcionada pelo polinizador mais efetivo (Stebbins 1970).

Especialistas utilizam um recurso ou apresentam adaptações a explorar recursos específicos (Waser e Ollerton 2006). Sendo assim em um estudo de polinização determinar o referencial é importante: a flor é especialista, o animal é especialista, ou a interação é especializada? Todas as variantes nessas três indagações podem ser válidas dependendo do referencial. Exemplificando a ideia, podemos citar o clássico trabalho de Lindsey (1984). Ao estudar a polinização de *Thaspium* e *Zizia* (Apiaceae) foi verificado que as flores foram procuradas por visitantes florais de muitas espécies e que a maioria consistia em polinizadores efetivos. As flores dessas espécies não apresentam nenhum atributo que exclua visitantes

potenciais. Pelas características morfológicas das flores, seria incluída na síndrome de flores polifílicas. Nessa interação, embora, vários pequenos insetos visitam as flores, as abelhas eram os mais frequentemente coletados e, além disso, várias das espécies de abelhas eram oligoléticas. Abelhas oligoléticas são especializadas em coletar grãos de pólen em plantas relacionadas filogeneticamente (Robertson 1925, Cane e Sipes 2006), ou seja, limitam suas fontes de pólen à espécies do mesmo gênero ou da mesma família, nesse caso, a das Apiaceae. Na ausência de mais informações, e com base nesse exemplo podem-se tirar conclusões distintas: 1) a interação é generalista, já que as flores tem morfologia simples; 2) a interação é generalista, já que são visitadas por várias espécies de insetos; 3) a interação é especializada, já que abelhas oligoléticas são os visitantes mais frequentes e efetivos. Assim a correta interpretação dessa interação e suas implicações para a evolução das flores de Apiaceae são determinadas pela delimitação do referencial.

A escala também deve ser definida, tanto a escala física (a distribuição geográfica da interação), a escala taxonômica (número de parceiros e quantidade de fenótipos diferentes dentro de uma unidade taxonômica) bem como a escala conceitual (delimitação do conceito de especializado). Exemplificando podemos tomar a interação entre algumas espécies de Bignoniaceae e seus visitantes florais. Geralmente flores dessa família apresentam corolas tubulares que excluem visitantes florais com peças bucais curtas de acessarem o néctar (Gentry 1974, 1980). Nesse caso, as flores de bignoniaceae são especializadas em visitantes florais de peças bucais longas. Entretanto, existem muitas espécies de abelhas ou beija flores, por exemplo, que visitam flores de bignoniáceas (Gentry 1992), desde grandes abelhas como *Bombus* (Apidae, Bombini) até diminutas espécies de *Trigonisca* (Apidae, Meliponini). Além disso, abelhas é um grupo enorme de espécies comparado com o pequeno grupo de aves. *Tabebuia impetiginosa* (Bignoniaceae), por exemplo, apresenta ampla distribuição geográfica, desde o México a Argentina (Gentry 1992) e certamente as espécies polinizadoras não são as mesmas ao longo de sua distribuição.

Existem flores com características morfológicas ou atributos florais especializados (Vogel 1954, Stebbins 1970). Filtros florais que impedem a visita de animais sem determinadas características morfológicas, fisiológicas ou comportamentais são exemplos de flores especializadas (Jonhson e Steiner 2000, 2003). Outras flores não apresentam nenhuma característica morfológica que impeça a visita de determinados grupos de polinizadores tal como em várias espécies de Asteraceae. No entanto há flores sem aparentemente nenhum filtro, mas que somente é visitado por grupos restritos de polinizadores. Que algumas plantas protegeriam quimicamente grãos de pólen e ou produziram substancias repulsivas (Praz et al. 2008b, Schiestl 2010) são hipóteses propostas para explicar esse fenômeno. Entretanto é notável

que nem sempre interações entre flores com morfologia generalista são polinizadas por polinizadores generalistas e vice-versa.

Atualmente é consenso que generalização e especialização em sistemas de polinização se distribuem em um contínuo entre os extremos da relação espécie-específicas até amplamente generalistas (Waser e Ollerton 2006). Uma série de modelos foram propostos para explicar a evolução de flores nesse conflito. Stebbins (1970) foi um dos pioneiros e postulou que a evolução das flores era dirigida pelo polinizador mais efetivo. Waser et al. (1996) mostrou que como a maioria dos processos ecológicos é dirigido em interações generalistas, postulou que a evolução das flores era mais influenciada pelo polinizador mais abundante. Já Aigner (2001) formulou a hipótese de que a especialização em sistemas de polinização em plantas se dá somente quando o *fitness* marginal ganho excede o *fitness* marginal perdido por um determinado tipo de polinizador, e que sendo assim até mesmo polinizadores pouco eficientes e abundantes poderiam guiar a seleção de caracteres fenotípicos. Outras variáveis importantes tal como a filogenética e demográfica, entretanto, não foram incluídas nos modelos (Morgan 2006).

Variáveis da especialização dos visitantes também não foram incluídas nos modelos. Embora as teias de interações sejam descritas como assimétricas, ou seja, enquanto as flores se especializaram em grupos funcionais de polinizadores, considera-se que é raro para insetos polinizadores se especializarem em uma única ou poucas espécies de plantas (Vazquez e Aizen 2004). Sabe-se também que espécies generalistas interagem com um subconjunto pequeno de espécies em nível local (Thompson 2005). Vários grupos de plantas são polinizados essencialmente por abelhas oligoléticas, por exemplo, (e. g. Schlindwein 2004). Mesmo que incompleto, o modelo de Aigner (2001) é o que melhor explica a especialização em sistemas de polinização, embora o mais provável é que diferentes linhagens tenham histórias evolutivas regidas por variáveis locais. Um modelo definitivo talvez seja deveras complexo, e somente válido para linhagens restritas (Jonhson 2006).

As delimitações de referencial e escala são igualmente válidas para interpretações da evolução entre as abelhas e suas relações (Waser 2006). Entre elas, como na maior parte dos animais herbívoros, há espécies generalistas e especialistas (Bernays 2001). Herbívoros especialistas têm em seu arsenal adaptativo uma limitação fisiológica ou neural que os restringem a uma determinada fonte de alimento ou outro recurso necessário a sua vida; já para os generalistas essas limitações são menores, e eles podem explorar um nicho teórico mais amplo (Bernays 2001). Especializações em espécies e ou grupos de abelhas são vastas e dependem das adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais das espécies. Abelhas coletoras de óleos florais, por exemplo, são especialistas. Abelhas de clados não relacionados tais como Centridini, Tapinotaspinidi e Melitini são especialistas em coletar lipídeos produzidos

por glândulas em flores que fornecem esse produto (Vogel 1969). Já machos de abelhas Euglossini são especializados na coleta de odores florais (Roubik 1989). Existem também abelhas que voam a noite tais como alguns gêneros de Augochlorini, sendo assim especializados em explorar recursos em tais condições ambientais (Wcislo e Tierney 2009). Quanto à coleta de pólen, existem as abelhas oligoléticas, (Robertson 1925, Cane e Sipes 2006). Sendo assim, embora os polinizadores possam ser especialistas, o processo de polinização nos sistemas frequentemente é generalista (Waser et al. 1996).

Sejam em sistemas de polinização generalizado ou especializado, as plantas com flores evoluíram juntamente com polinizadores (Feinsinger 1983, Herrera 1996). Prova dessa hipótese é a radiação das angiospermas que ocorreu ao mesmo tempo que a diversificação das abelhas (Grimaldi 1999, Grimaldi e Engel 2005). Embora essa hipótese tenha sido contestada recentemente (Ren et al. 2009), aparentemente a evolução paralela entre esses dois grupos realmente ocorreu (Ollerton e Coulthard 2009). Sabendo que as interações polinizador-planta são dirigidas pelo paradoxal trade-off entre exportação e importação de grãos de pólen, a seleção natural favoreceu mutantes com *fitness* reprodutivo mais alto. A especiação teoricamente se processa nos dois extremos da curva teórica normal, entre *fitness* e fenótipo floral (Aigner 2001). Assim o *fitness* teórico não pode ser negligenciado, já que o sucesso reprodutivo diferenciado é selecionado (Darwin 1876, Morgan 2006).

Características florais e intrínsecas dos polinizadores são importantes na determinação do *fitness* em uma interação. A morfologia da flor, a distribuição geográfica da interação, a especialização do polinizador, bem como a capacidade de comunicação entre as espécies mutualistas são variáveis importantes nessa avaliação. Como em interações especializadas o número de variáveis normalmente é menor, estes são excelentes modelos para entender o processo como um todo.

1.2. Comunicação química entre flores e polinizadores

As plantas fornecem aos polinizadores pistas que sinalizem a presença de um recurso, geralmente visual e olfativo com a função única de comunicação (Raguso 2008, Dötterl e Vereecken 2010).

Entre os canais de comunicação interespecíficos, em sistemas de polinização os sinais químicos são reconhecidamente importantes (Herrera 1996, Raguso 2008, Schiestl 2010) e foram reportadas desde os primeiros trabalhos em polinização (Kölreuter 1761, Sprengel 1793,

Müller 1873). O odor das flores sempre foi considerado atrativo, ou seja, os sinais percebidos pelos visitantes e que comunicariam a presença de um recurso a ser coletado pelo visitante. Entretanto, é conflitante pensar que as plantas produzem odores para repelir herbívoros de folhas e também para produzir atrativos para herbívoros florais. A hipótese mais aceita para explicar o surgimento da interação entre polinizadores e flores postula que os primeiros polinizadores seriam herbívoros de pólen e que evolutivamente as plantas passaram a usar esses herbívoros para aumentar a possibilidade da reprodução sexuada cruzada (Grimald e Engel 2005). Recentemente Schiestl (2010) demonstrou que algumas plantas mimetizam sinais químicos já utilizados pelos animais para própria comunicação em benefício de receberem visitas às flores. Evolutivamente as plantas passaram a usar os mesmo sinais usados na comunicação entre os animais para atrair polinizadores. Essa hipótese é bastante atraente, principalmente quando se correlaciona a presença de determinadas substâncias em feromônios de insetos com os constituintes químicos dos buques florais de plantas (Schiestl 2010). De qualquer forma, sabe-se que os odores são importantes atrativos, embora ainda poucas substâncias isoladas sejam reconhecidas como atraentes de polinizadores (Raguso 2008).

1.3. Como abelhas encontram flores?

Embora aparentemente simples um dos grandes desafios na vida de uma abelha é encontrar alimento. Ainda quando larva obteve tudo que necessitava dentro do ninho, provisionado pela genitora. Adultos emergem sem experiência prévia e sendo uma espécie solitária, necessitam rapidamente buscar alimentos em flores. Herbívoras, abelhas adultas consomem néctar além de pequenas porções de pólen. Já as larvas consomem uma massa constituída de pólen e néctar além de, em algumas espécies, óleos florais e substâncias glandulares coletados e/ou produzidos pela mãe (Michener 2007).

Ao emergir, uma abelha solitária depara-se com um ambiente muito diferente daquele onde cresceu, desenvolveu e metamorfoseou. O ambiente confinado do ninho é estável e com alimento em abundância. Entretanto, o ambiente externo é limitante principalmente pelo espaço e por fontes de alimento. Embora abelhas e outros herbívoros naivos (inexperientes, sem contato prévio com as flores hospedeiras) testem fontes de alimento antes de consumi-los (Schiestl 2010), as abelhas devem ter, de forma inata, meios de reconhecer e encontrar os recursos que necessitam para sua alimentação, e posteriormente para provisionamento do próprio ninho (Dobson 1987, Dobson e Bergström 2000).

Em abelhas oligoléticas, a mãe provisiona o ninho com grãos de pólen e assim as crias tem contato com substâncias de suas hospedeiras, sem estímulos visuais. As abelhas naivas devem encontrar as flores corretas e isso só é possível admitindo a existência de canais

químicos de comunicação entre os parceiros (Dobson 1987). Abelhas generalistas forrageadoras de *Apis mellifera* naivas não são estimuladas somente pelo sinal visual durante as primeiras visitas a flores, sendo necessário um sinal químico (eg. Giurfa et al. 1995). Isso também seria esperado para abelhas oligoléticas. Entretanto Dobson e Bergström (2000) mostraram experimentalmente que abelhas oligoléticas naivas de *Chelostoma florisomne* apesar de reconhecerem a protoanemonina, odor específico produzido pelo pólen de suas hospedeiras, somente tinham comportamento de coleta na adição do sinal visual específico amarelo. Após tornarem-se experientes as abelhas ficaram mais sensíveis ao complexo buquê floral das espécies de *Ranunculus* (Ranunculaceae) até mesmo mais que os sinais visuais das espécies. Burger et al. (2010a e b) mostraram que sinais visuais dos seus hospedeiro *Echium vulgare* eram atraentes para forrageadoras naivas, enquanto que sinais olfativos sozinhos não eram. Todavia essas abelhas necessitavam do sinal olfativo para discernir suas hospedeiras. As abelhas foram estimuladas pela cor semelhante de uma espécie não hospedeira. Já para *Macropis fulvipes* (Melittidae) oligoléticas em *Lysimachia* o sinal olfativo, mas não o visual foi atraente as naivas embora a combinação dos dois sinais provocasse maior atração. Em *Chelostoma rapunculi* ambos os sinais foram atrativos as naivas (Milet-Pinheiro et al. 2012). De forma geral os estudos têm mostrado que tanto para abelhas especializadas como para generalistas naivas ou experientes dependem a combinação dos sinais olfativos e visuais para encontrar recursos (Dötterl e Vereecken 2010). Nesse sentido o contexto biológico e ecológico de cada interação deve ser investigado (Dobson e Bergström 2000). Pouco conhecido ainda, é o papel de odores individuais na atratividade das espécies (Dötterl e Vereecken 2010).

1.4. Oligoetia e odores florais específicos

Em interações envolvendo abelhas oligoléticas, frequentemente as flores são polinizadas por várias espécies de abelhas (e.g Schlindwein e Medeiros 2006), entretanto normalmente as espécies mais frequentes ou eficientes são as oligoléticas (Cane et al., 1985, Neff e Rozen, 1995, Schlindwein e Wittmann, 1995, 1997a, b, Schlindwein e Martins, 2000, Larsson, 2005, Schlindwein 2004, Schlindwein et al., 2005, Carvalho e Schlindwein 2011, Milet-Pinheiro e Schlindwein 2010). São poucos os casos relatados que mostram que abelhas oligoléticas poderiam diminuir o sucesso reprodutivo das plantas hospedeiras ou serem indiferentes (Linsley et al., 1963a, b, 1964, Barrows et al., 1976, Grant e Grant, 1979, Grant e Hurd, 1979). É notório que há maior dependência das abelhas pelos recursos de pólen. Interdependência reprodutiva nesses casos é raro, entretanto alguns casos são conhecidos. Há interdependência reprodutiva entre *Ceblurgus longipalpis* (Halictidae, Rophitini) e sua planta hospedeira *Cordia leucocephala* (Cordiaceae). A planta, que é heterostílica, somente é visitada e polinizada por

abelhas dessa espécie, sendo esse um dos poucos casos de monoletia conhecidos. Nas flores as anteras incluídas dentro de um tubo floral comprido impossibilita acesso a outras abelhas ao recurso néctar e pólen. Somente a espécie oligolética, adaptada com peças bucais longas dotadas de pelos especializados, coletam o néctar no fundo das corolas e o pólen escondido no tubo floral (Milet-Pinheiro e Schlindwein 2010). Outro caso estudado recentemente é a interação entre *Protodiscelis palpalis* (Colletidae, Neopasiphaeinae) e flores de *Hydrocleys martii* (Alismataceae) em alagados efêmeros na Caatinga. Nesse caso a adaptação também é comportamental. *P. palpalis* foi a única espécie capaz de adentrar os estaminódios que protegem o pólen no interior de uma câmara de pólen, sendo a única abelha efetiva na polinização dessa espécie no ambiente de Caatinga (Carvalho e Schlindwein, 2011).

O fenômeno da oligoletia tem proporcionado a formulação de uma série de perguntas, a partir de descrições de interação entre abelhas oligoléticas e plantas relacionadas em mais de 100 anos de estudos (eg. Robertson 1899, 1925, Cane e Sipes 2006). A pergunta final e mais intrigante é: por que há abelhas oligoléticas? Essa pergunta ainda está longe de ser respondida. Entretanto uma série de hipóteses tem sido testada em anos recentes e que nos ajudam a entender essa interação. Sabe-se que abelhas oligoléticas, de uma forma geral, apresentam fenologia correlata com a planta recurso (Linsley 1958) e adaptações morfológicas para coletar e manipular de forma adequada o pólen dessas plantas (Müller 1996). Linsley (1958) especulou que abelhas oligoléticas também deveriam ter adaptações em relação a sinais visuais e morfológicos, sincronização fenológica, sincronização entre o horário das visitas e abertura das flores, e comportamento adequado que aumente a eficiência na coleta do pólen, o que foi corroborado posteriormente em várias publicações (eg. Schlindwein e Wittmann 1995, 1997a,b, Schlindwein 2000, Alves-dos-Santos e Wittmann 1999, Schlindwein e Medeiros 2006). Entretanto, abelhas poliléticas também coletam pólen com grande eficiência (Minckley e Roulston 2006).

A oligoletia é uma característica geneticamente determinada (Praz et al. 2008a, Sedivy et al. 2008), e recentemente foi mostrado que larvas de abelhas oligoléticas falharam em desenvolver-se em pólen de espécies de plantas não relacionadas, sendo assim, foi proposta a hipótese de que as plantas devem proteger os grãos de pólen com compostos tóxicos, semelhante àquelas plantas que protegem suas folhas com compostos secundários (Praz et al. 2008b). Assim, as plantas selecionam seus visitantes florais quimicamente. As abelhas oligoléticas perceberiam olfativamente compostos voláteis específicos raros produzidos pelas flores das plantas hospedeiras para reconhecê-la (Dobson 1987, Dobson e Bergström 2000). Dobson e Bergström (2000) mostraram a importância de protoanemoninas no reconhecimento dos hospedeiros em *Chelostoma florisomne*. Dötterl et al. (2005a) atraíram fêmeas e machos de

Andrena vaga (Andrenidae) logo após o início da estação de emergência com um composto sintético análogo ao produzidos pelas flores de *Salix*. Dötterl e Schäffler (2007) mostraram a importância dos estratos odoríferos das flores de *Lysimachia* no reconhecimento das flores por *Macropis fulvipes*. Esses trabalhos indicam a importância de odores no reconhecimento das plantas hospedeiras pelas abelhas oligoléticas, embora os compostos atraentes para essas abelhas não sejam específicos de determinadas plantas. Normalmente são comuns em flores de várias espécies vegetais (ver Knudsen et al. 2006), permanecendo desconhecidos canais de comunicação únicos nessas interações.

Outra tentativa é uma explicação num contexto evolutivo. O entendimento de relações filogenéticas entre grupos de abelhas especializadas e suas plantas relacionadas foi recentemente alvo de estudos inovadores que examinaram os padrões de uso de fontes florais por abelhas em uma perspectiva histórica (Sipes e Tepedino 2005, Sipes e Wolf 2001, Larkin et al. 2008). Os resultados desses estudos indicam que oligoetia parece ser um caráter conservado dentro de linhagens de abelhas e que a oligoetia seria um caráter ancestral, contrariando uma série de assertivas anteriormente propostas e difundidas de que especialização seria derivada (Patiny et al. 2007, Larkin et al. 2008). As trocas de hospedeiros observadas dentro das linhagens não estariam relacionadas ao grau de parentesco entre as plantas (Larkin et al. 2008). A utilização de hospedeiros diferentes em espécies oligoléticas irmãs parece ser aleatória ou determinada pela escassez de um determinado recurso, ou ainda pelo desaparecimento local de um hospedeiro (Sipes e Tepedino 2005). Entender a importância dos odores florais nesse contexto é um próximo passo interessante.

2. Sobre os grupos estudados

2.1. As plantas

Plantas aquáticas constituem-se em um grupo não natural de espécies relativamente pequeno da diversidade total de plantas - entre 1 e 2%(Cook 1990). Espécies aquáticas exibem considerável heterogeneidade morfológica, taxonômica, ecológica e frequentemente ampla distribuição geográfica (Barrett et al. 1993). Algumas espécies crescem completamente submersas, outras apresentam apenas flores que emergem da água. Existem, também, espécies com hábito flutuante, anfíbio e emergente. Elas podem ser marinhas ou de água doce, e crescer em água corrente ou parada, regiões sazonalmente alagadas ou solos encharcados (Barrett et al. 1993).

Plantas aquáticas desempenham importante papel em ecossistemas de lagos, alagados temporários, rios e represas bem como no ambiente marinho. Afetam a qualidade da água,

assimilando nutrientes e substâncias nocivas (Esteves e Camargo 1986), influenciam no aporte e ciclagem desses nutrientes (Esteves 1998, Pagioro e Thomaz 1999), sendo indispensáveis na conservação da diversidade de peixes (Pott e Pott 1997, Agostinho et al. 2002), aumento da riqueza da comunidade planctônica (Lansac-Thôa et al. 2003) e de outros macroinvertebrados (Takeda et al. 2003). Compreendem a base da teia alimentar aquática em vários ecossistemas (Niering 1985, Esteves 1998).

Entre as plantas, tem sido demonstrada alta incidência de espécies invasoras entre as macrófitas de água doce (Daehler 1998). Esse danoso processo acarreta riscos ambientais e econômicos (Elton 1958, Richardson e Pysek 2008, Barrett 2011). Alguns aspectos como alta plasticidade fenotípica e alta capacidade de reprodução destacam-se entre os fatores adaptativos importantes em invasões biológicas entre essas plantas (Barrett et al. 1993, Barrett 2011). O crescimento excessivo de algumas espécies, mesmo em ambientes nativos, no entanto, é danoso tanto para o ecossistema, quanto para empreendimentos humanos (Esteves 1998). Algumas pragas como *Eichornia crassipes* (Pontederiaceae) crescem desordenadamente em ambiente com muita matéria orgânica e dificulta a navegação em rios. *Egeria najas* e *E. densa* (Hydrocharitaceae) entope as entradas das turbinas das hidrelétricas (Thomaz e Bini 2003). Há, também àquelas que causam prejuízos para a agricultura como várias espécies de *Sagittaria* (Alismataceae), *Butomus umbellatus* (Butomaceae) (Brown e Eckert 2005) e *Limnocharis flava* (Alismataceae) (Song et al. 2000, Waterhouse, 2003).

Plantas aquáticas se reproduzem sexuadamente por sementes e assexuadamente por estruturas vegetativas diversas: estolões, tubérculos e módulos (Barrett et al. 1993). A estratégia reprodutiva pode variar com o nível de estresse ambiental (Honnay e Bossuyt 2005), e quebras de autoincompatibilidade genética tem sido reportada para diversas populações em várias espécies (Barrett et al. 1993).

Dentre as ordens de plantas reconhecidas pelo sistema de classificação APG III (2009), Alismatales é a que detém maior número de espécies aquáticas (APG III 2009). É composta por 13 famílias de monocotiledôneas basais. Dentre elas, as famílias Araceae, Alismataceae e Hydrocharitaceae são as mais especiosas.

2.1.1. Alismataceae

Alismataceae pertence ao clado das alismatales que representa importante grupo para o entendimento de todas as relações filogenéticas entre as angiospermas (Soltis et al. 2005). É um grupo pouco derivado em que se discute seu posicionamento na base do clado monocotiledôneas, embora seu real posicionamento ainda permaneça obscuro, principalmente

pela politonia com Acorales (Chen et al. 2004b). Alismataceae é uma das famílias mais especiosas da ordem (APG 2009).

A delimitação de Alismataceae, Butomaceae e Limnocharitaceae foi controversa no passado. Limnocharitaceae foi incluída por Lawrence (1951) e Hutchinson (1959) em Butomaceae, enquanto Dahlgren (1975), Pichon (1946) e Thorne (1976) a incluíram em Alismataceae (Haynes e Holm-Nielsen 1992). Cronquist (1981) aceitam Butomaceae, Limnocharitaceae e Alismataceae como famílias distintas. O APG II (1998) reconheceu Alismatales como clado monofilético e Limnocharitaceae como família. Entretanto APG III (2009) comenta que não encontrou caracteres que poderiam separar as famílias, principalmente após tratamentos moleculares mais aprofundados (Les et al. 1997, Chen et al. 2004a, Li e Zhou 2009). APGIII (2009) reconhece o clado formado pelas famílias Butomaceae e Hydrocharitaceae, sendo irmão de Alismataceae (incluindo Limnocharitaceae). Na hipótese filogenética mais recente esse clado apresenta dois subclados: clado B formado pelos gêneros *Luronium* Raf., *Damasonium* Mill., *Baldellia* Parl., e *Alisma* L., e o clado A formado pelos demais gêneros: *Burnatia* Micheli, *Caldesia* Parl., *Echinodorus* Engelm., *Helanthium* (Benth.) Britton, *Limnophyton*, Miq., *Sagittaria* L., *Machaerocarpus* Small, *Ranalisma* Stapf, *Wiesneria*, Micheli., *Limnocharis* Humb. & Bonpl. e *Hydrocleys* Rich. No clado A, há a formação de um grupo monofilético formado pelas espécies neotropicais de Limnocharitaceae sensu strito (Les et al. 1997, Chen et al. 2004, Lehtonen e Myllys, 2008, Lehtonen 2009, Chen et al. 2012) e único gênero paleotropical da antiga família Limnocharitaceae, *Butomopsis* Kunth permanece com posicionamento incerto, embora seja intimamente relacionado a *Limnocharis* (APG III, 2009, Chen et al. 2012).

Nos Neotrópicos o clado Alismataceae (Alismataceae+limnocharitaceae) apresenta cinco gêneros, *Echinodorus*, *Sagittaria*, *Helanthium*, *Limnocharis* e *Hydrocleys* (Haynes e Holm-Nielsen, 1992, 1994, Haynes et al. 1998, Soltis et al. 2005, Lehtonen 2009). Os estudos recentes tem mostrado que Alismataceae surgiu por volta do cretáceo superior (102 a 79 milhões de anos antes do presente) e que a divergência entre os clados, mesmo que ainda incerta, se deu remotamente e variam entre 68 a 2,5 milhões de anos antes do presente (Chen et al. 2012). A hipótese mais provável é que o grupo tenha se originado na Região oeste do Paleártico ou na Região Afrotropical (Chen et al. 2012). Linhagens que dispersaram e divergiram para regiões isoladas, entretanto, apresentam histórias evolutivas únicas, que ainda carecem de investigação. Para os gêneros ocorrentes nos Neotrópicos ainda há carência de estudos recentes, mas Haynes e Holm-Nielsen (1992) propuseram que Limnocharitaceae sensu strito teria como centro de origem e diversificação a região que atualmente compreende o nordeste do Brasil, especialmente áreas dos estados brasileiros de Pernambuco e Paraíba

(Haynes e Holm-Nielsen 1989, 1992). Embora essa hipótese ainda não tenha sido corroborada em estudos moleculares, parece ser uma hipótese plausível, uma vez que seu grupo irmão de Limnocharitaceae é essencialmente africano e teria divergido no paleoceno. Limnocharitaceae teria origem gondwanica antes da separação (Chen et al. 2012). *Sagittaria* teria origem afrotropical e se dispersou a longa distância pelo globo. Já *Echinodorus* se originou nas Américas, provavelmente na América do Norte depois de divergir de *Caldesia*, que teria origem europeia. O gênero *Helanthium* é proximamente relacionado à *Echinodorus* e divergiu desse gênero recentemente (Chen et al. 2012).

Alismataceae são caracterizados pelo hábito herbáceo e aquático com flores trímeras, e gineceu apocárpico (Haynes et al. 1998). Alismataceae apresenta cerca de 14 gêneros e mais de 180 espécies, embora o tratamento genérico e específico seja considerado insatisfatório (Lehtonen 2009). No Brasil estão representados os gêneros *Echinodorus* (12 espécies), *Helanthium* (2), *Sagittaria* (4), *Hydrocleys* (5) e *Limnocharis* (2) (Haynes e Holm-Nielsen 1992, Matias 2007, 2010, Matias e Irgang 2006, Matias e Sousa 2011).

Entre as espécies neotropicais, todas as espécies apresentam flores com características tipicamente melitófilas, e as espécies com ecologia reprodutiva conhecida, polinizadas por abelhas (Vieira e Lima 1997, Pansarin 2009, Pansarin e Pansarin 2011, Carvalho e Schlindwein 2011). Abelhas do gênero *Protodiscelis* são reportadas como oligoléticas em Alismataceae sensu lato (Melo 1996, Vieira e Lima 1997, Carvalho e Schlindwein 2011). *Protodiscelis echinodori* foi o polinizador mais frequente de *Echinodorus grandiflorus* (sinônimo de *Echinodorus grandiflorus* subsp. *grandiflorus*) e *Echinodorus floribundus* (sinônimo de *Echinodorus grandiflorus* subsp. *aureus*) no cerrado de Minas Gerais (Vieira e Lima 1997, ver Lehtonen 2008). Além disso, é reportado como visitante floral de *E. grandiflorus* em São Paulo (Pansarin e Pansarin 2011). Machos e fêmeas de *Protodiscelis alismatis* até agora foram exclusivamente coletados em flores de *Echinodorus* (Alismataceae) (Ducke 1908, 1910, Zanella 2000, Carvalho e Schlindwein 2011) no nordeste do Brasil. *Protodiscelis palpalis* foi o polinizador único de *Hydrocleys martii* em alagados efêmeros na caatinga (Carvalho e Schlindwein 2011).

Estudos de polinização em espécies neotropicais de Alismataceae são raros. *Echinodorus grandiflorus* apresenta flores hermafroditas e sistema reprodutivo autoincompatível, enquanto que *E. floribundus* tem flores autocompatíveis (Vieira e Lima 1997, Pansarin e Pansarin 2011). Já *E. logipetalus* foi ginodióico e nas plantas com flores hermafroditas autocompatível (Pansarin 2009). A morfologia floral de todas as espécies estudadas é semelhante. As flores apresentam pétalas brancas e sépalas persistentes verdes e gineceu apocárpico com numerosos carpelos que formam aquênios com semente única. O

androceu é formado por diversos estames que circundam o gineceu. As anteras são amarelas. Em flores femininas de *E. longipetalus* há a presença de estaminódios amarelos que mimetizam os estames de flores hermafroditas. Todas as espécies forneceram néctar e pólen aos visitantes florais e tiveram longevidade entre 7-8 horas (Vieira e Lima 1997, Pansarin 2009, Pansarin e Pansarin 2011).

Hydrocleys martii possui flores autoincompatíveis. As flores amarelas dessa espécie apresentam estaminódios que protegeram os recursos de pólen dentro de uma câmara central na flor. Somente abelhas de *P. palpalis* foi comportamentalmente adaptada a acessar o pólen no interior dessa câmara sendo o único polinizador efetivo da espécie na caatinga (Carvalho e Schlindwein 2011). Flores de *Limnocharis flava* não foram visitadas por abelhas na China, local onde essa espécie é invasora e produz grande quantidade de sementes mesmo na ausência de visitas (Song et al. 2000).

2.2. As abelhas

2.2.1 Tratamento taxonômico de Colletidae Lepeletier, 1841 e Protodictylus Brèthes, 1909

A família Colletidae tem recebido em anos recentes atenção quanto ao seu posicionamento filogenético. Colletidae foi tratada classicamente como grupo irmão de todas as outras abelhas (Michener 1944, 1974, 1979, Engel 2001). Alexander e Michener (1995), entretanto, através de dados morfológicos propuseram novas hipóteses quanto a seu posicionamento, uma vez que foi duvidoso o posicionamento dependendo do tipo de análise da matriz de dados (Michener 2007, Almeida e Danforth 2009). Danforth et al. (2006a) propôs, através da reanálise dos dados morfológicos de Alexander e Michener (1995) adicionados a dados moleculares, que Colletidae seria o grupo derivado entre as abelhas, posicionando Mellitidae na base da árvore (Danforth et al. 2006a e b).

A parede da célula de cria revestida com uma substância parecida a celofane, características únicas do aparelho bucal, e a presença de um único intron na copia F1 do gene elongation fator-1 α são consideradas fortes sinapomorfias que sustentam a monofilia de Colletidae (excluindo Stenotritinae pela classificação clássica do Michener (1944) (McGinley 1980, Brady e Danforth 2004, Danforth et al. 2006a, 2006b, Almeida 2008a, Almeida e Danforth 2009). A partir de uma hipótese filogenética bem embasada, Almeida e Danforth (2009) propuseram então a classificação de Colletidae dividida em sete subfamílias: Colletinae, Euryglossinae, Diphaglossinae, Hylaeinae, Paracolletinae, Scapterinae e Xeromelissinae. Entretanto esses mesmos autores comentaram o posicionamento dos gêneros *Paracolletes* e *Callomelitta* como inserto em Paracolletini sensu Michener, que foi considerado parafilético e

tratado como ‘Paracolettinae’ (Almeida e Danforth 2009, Almeida 2008b). Na ausência do gênero tipo da subfamília o nome Neopasiphaeinae Cockerell 1930 foi adotado para o clado Paracolletinae menos *Paracolletes* (Almeida et al. 2012). A classificação proposta mais recente (Almeida et al. 2012) considera o grupo com oito subfamílias: Colletinae, Callomelittinae, Diphaglossinae, Euryglossinae, Hylaeinae, Neopasiphaeinae, Scapterinae e Xeromelissinae; *Paracolletes* é tratado como incertae sedis dentro de Colletidae, uma vez que não posiciona-se em nenhuma das subfamílias, embora os autores comentem sua relação próxima com Diphaglossinae.

Colletidae é um grupo heterogêneo de abelhas com distribuição cosmopolita, com ocorrência predominantemente no hemisfério sul. Apresenta 2423 nomes válidos de espécies (Ascher e Pickering, 2010) e sua diversificação inicial teve início no fim do período Cretáceo a cerca de 70 milhões de anos antes do presente no continente de Gondwana, antes de sua completa separação com a Austrália via Antártica (Almeida et al. 2012). A presença de Scapterinae no sul da África pode ser explicada por um único processo de dispersão ocorrido entre Austrália e África, enquanto as demais linhagens tiveram vários ciclos de intercambio entre América do Sul e Austrália via Antártica ainda no período em que esse continente apresentava florestas subtropicais. A diversificação do grupo nesses dois continentes resultou das mudanças climáticas e aridificação o que também resultou na diversificação de suas floras (Almeida et al. 2012).

O gênero *Protodiscelis* Brèthes, 1909 pertence à subfamília Paracolletinae sensu Silveira et al. (2002) ou a subfamília Neopasiphaeinae sensu Almeida et al. (2012). O gênero é caracterizado pelo alongamento pouco usual dos palpos maxilares, labro diferenciado alongado e com projeções laterais e pelos extremamente plumosos no metassoma, coxa, trocantes e fêmur. No Brasil estão representadas quatro espécies descritas: *P. alismatis* (Ducke, 1909) *P. palpalis* (Ducke 1909) *P. echinodori* Melo 1996, *P. spathigera* (Michener, 1989) e algumas espécies ainda não descritas, incluindo uma amostrada durante a realização dessa tese. Todos os representantes do gênero são oligolético em flores de Alismataceae (Melo 1996, Carvalho e Schlindwein 2011). Neopasiphaeinae divergiu das outras linhagens de Colletidae por volta de 49 Ma e teria origem no sul da América do Sul (Almeida et al. 2012).

3. Sobre a atratividade de Megalopta a odores florais

Adicionalmente aos trabalhos desenvolvidos no sistema *Protodiscelis*-Alismataceae, foi realizado um trabalho com atratividade de abelhas de *Megalopta* a odores florais. Embora o sistema seja muito diferente, é importante para o entendimento da função das pistas de odor no encontro entre parceiros mutualistas.

3.1. Como encontrar flores à noite?

Espécies de abelhas que forrageiam em baixa intensidade luminosa são reportadas em cinco famílias de abelhas, das quais quatro delas apresentam representantes com comportamento noturno obrigatório, que se desenvolveu independentemente pelo menos 19 vezes dentro das linhagens de abelhas (Wcislo e Tierney 2009). Esse comportamento teria surgido em respostas às pressões de predação e parasitismo (Wcislo et al. 2004), e competição por recursos limitados (Kelber et al. 2006, Somanathan et al. 2008). Em resposta a essa mudança de nicho, adaptações principalmente quanto à visão têm sido estudadas (revisão em Warrant 2008). Em estudos com *Megalopta genalis* e *Xylocopa tranquebarica* sabe-se que as marcas visuais são aprendidas e que auxiliam a abelha a encontrar novamente seu ninho depois de uma viagem de forrageio (Warrant et al., 2004, Greiner et al., 2007b, Somanathan et al., 2008). Para enxergar com baixa luminosidade *Megalopta* sacrificou seu poder de visão acuada (visão de detalhes) bem como diminuiu a percepção de cores (Warrant et al., 2004, Theobald et al. 2007). Entretanto os sinais que conduzem as abelhas noturnas às flores, ainda não era bem conhecido (Carvalho et al. 2012).

Em vários outros sistemas de polinização noturnos, os odores florais são importantes marcas de encontro entre parceiros (Raguso e Wills 2002, Dobson 2006). Por razões das limitações da visão sob baixa luminosidade e a exacerbada produção de odores por flores com antese noturna, a qualificação e experimentos de atração foram melhores descritos para polinizadores noturnos (Dobson 2006). Na síndrome de quiropterofilia, sabe-se, por exemplo, que compostos sulfurosos têm importante papel na atração dos morcegos (Knudsen e Tollsten 1995). Na esfingofilia, sesquiterpenos oxigenados são comuns a várias espécies de plantas polinizadas por essas mariposas (Dobson 2006). Nos neotrópicos, é bem documentado que flores polinizadas por besouros Cyclocephalini produzem grande quantidade de odores volatilizados pela termogênese floral em espécies de Annonaceae e Araceae (revisão em Dobson 2006). Entretanto sobre compostos produzidos por flores polinizadas por abelhas noturnas pouco é conhecido.

Abelhas de *Megalopta* Smith 1853 (Halictidae, Augochlorini) são abelhas de hábitos crepusculares e noturnos. Adaptaram-se a um nicho extremo entre as abelhas (Warrant et al. 2004, Wcislo e Tierney 2009). São reconhecidas 26 espécies distribuídas principalmente nos neotrópicos desde o México central até o norte da Argentina (Moure et al. 2007 e referências desse livro), além de várias espécies ainda não descritas (Leandro M Santos comunicação pessoal). Constroem ninhos em madeira morta especialmente de lianas e galhos geralmente dentro de áreas de floresta (Wcislo e Tierney 2009). Apresentam comportamento social complexo, tendo algumas espécies como facultativamente eusociais (Smith et al. 2003, 2008).

Espécies desse gênero são pouco representadas em coleções entomológicas devido a seu hábito e, por isso, pouco se conhece sobre sua biologia (Wcislo e Tierney 2009).

Dados sobre fontes de recurso floral para espécies de *Megalopta* são escassos, mas sabe-se que as espécies são poliléticas (Willian Wcislo comunicação pessoal). Janzen (1968) sugeriu que as espécies de *Megalopta* forrageiam no alto das copas das árvores entretanto somente confirmou *Megalopta centralis* coletando pólen em *Solanum* sp. (Solanaceae), néctar em *Calathea insignis* (Marantaceae), e pólen de *Ipomoea trifida* (Convolvulaceae) espécies do sub-bosque (Janzen 1968, 1983). Bullock et al. (1987) reportou fêmeas de uma espécie de *Megalopta* coletando pólen em uma espécie primariamente esfingófila, *Ipomoea wolcottiana* (Convolvulaceae) no México. Mori e Boeke (1987) argumentaram que *M. genalis* é o polinizador mais provável de *Gustavia augusta* (Lecythidaceae) na Guiana Francesa, onde as abelhas foram observadas vibrando as flores. No Panamá, Wolda e Roubik (1986) coletaram um grande número de *Megalopta* em armadilhas de luz colocadas no alto das copas de *Tachigalis versicolor* (Fabaceae), sugerindo que flores dessa espécie seria recurso chave para espécies de *Megalopta*. Hopkis et al. (2000) observaram que *Parkia velutina* (Fabaceae) é primariamente polinizada por espécies de *Megalopta* que coletam pólen nas inflorescências da espécie. Esses autores discutiram também que *Parkia multijuga* também seria polinizada por *Megalopta*, embora o número de visitas observadas tenha sido muito pequeno. Espécies de *Megalopta* também foram observadas coletando pólen em várias espécies polinizadas primariamente por besouros ou morcegos (Gostsberger 1991, Listabarth 1996, Roulston 1997). Em vários desses casos observados há menção sobre o forte odor das flores. Entretanto, a função específica de compostos individuais na atratividade dessas abelhas ficou desconhecida.

4. Referencias Bibliográficas

Agostinho AA, Thomaz SM, Baltar LSMA, Gomes LC. 2002. Influence of aquatic macrophytes on fish assemblages structure of the upper Paraná River floodplain (Brazil). In: Proceedings of the 11th EWRS International Symposium on Aquatic Weeds. EWRS 69-72.

Aigner PA. 2001. Optimality modeling and fitness trade-offs: when should plants become pollinator specialists? *Oikos* **95**: 177–84.

Aigner PA. 2004. Floral specialization without trade-offs: optimal corolla flare in contrasting pollination environments. *Ecology* **85**: 2560–9.

Alexander BA, Michener CD. 1995. Phylogenetic studies of the families of short-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). *University of Kansas Scientific Bulletin* **55**: 377–424.

Almeida EAB. 2008a. Revised species checklist of the Paracolletinae (Hymenoptera, Colletidae) of the Australian Region, with the description of new taxa. *Zootaxa* **1891**: 1–24.

- Almeida EAB. 2008b.** Colletidae nesting biology (Hymenoptera: Apoidea). *Apidologie* **39**: 16–29.
- Almeida EAB, Danforth BN. 2009.** Phylogeny of colletid bees (Hymenoptera: Colletidae) inferred from four nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **50**: 290–309.
- Almeida EAB, Pie MR, Brady SG, Danforth BN. 2012.** Biogeography and diversification of colletid bees (Hymenoptera: Colletidae): emerging patterns from the southern end of the world. *Journal of Biogeography* **39**: 526–544.
- Alves-dos-Santos I, Wittmann D. 1999.** The proboscis of the long-tongued Ancyloscelis bees (Anthophoridae/Apoidea), with remarks on flower visits and pollen collecting with the mouth parts. *Journal of the Kansas Entomological Society* **72**: 253–264.
- APG II (The Angiosperm Phylogeny Group). 1998.** An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **85**: 531–553.
- APGIII (The Angiosperm Phylogeny Group). 2009.** An update of the Angiosperm Phylogenetic Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 105–121.
- Ascher JS, Pickering J. 2010.** Bee species guide (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). November 2010. http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species
- Barrett SCH, Eckert CG, Husband BC. 1993.** Evolutionary processes in aquatic plant populations. *Aquatic Botany* **44**: 105–145.
- Barrett SCH. 2011.** Why reproductive systems matter for the invasion biology of plants. In: Richardson DM, editor. Fifty years of invasion ecology: The legacy of Charles Elton. Oxford: Oxford University Press. pp. 195–210.
- Barrows EM, Chabot MR, Michener CD, Snyder TP. 1976.** Foraging and mating behavior in *Perdita texana* (Hymenoptera: Andrenidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **49**: 275–279.
- Bernays EA. 2001.** Neural limitations in phytophagous insects: Implications for diet breadth and evolution of host affiliation. *Annual Review of Entomology* **46**: 703–727.
- Brady SG, Danforth BN. 2004.** Recent intron gain in elongation factor-1 α of colletid bees (Hymenoptera: Colletidae). *Molecular Biology and Evolution* **21**: 691–696.
- Brown JS, Eckert CG. 2005.** Evolutionary increase in sexual and clonal reproductive capacity during biological invasion in an aquatic plant *Butomus umbellatus* (Butomaceae). *American Journal of Botany* **92**: 495–502
- Bullock SH, Ayala R, Baker I, Baker HG. 1987.** Reproductive biology of the tree Ipomoea wocottiana (Convolvulaceae). *Madrono* **34**: 304–314.
- Burger H, Ayasse M, Häberlein CM, Schulz S, Dötterl S. 2010a.** Echium and Pontechium specific floral cues for host-plant recognition by the oligolectic bee *Hoplitis adunca*. *South African Journal of Botany* **76**: 788–795.

- Burger H, Dötterl S, Ayasse M. 2010b.** Host-plant finding and recognition by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee. *Functional Ecology* **24**: 1234-1240.
- Cane JH, Eickwort GC, Wesley FR, Spielholz J. 1985.** Pollination ecology of *Vaccinium stamineum* (Ericaceae: Vaccinioideae). *American Journal of Botany* **72**: 135–142.
- Cane JH, Sipes S. 2006.** Characterizing Floral Specialization by Bees: Analytical Methods and Revised Lexicon for Oligolecty. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plan-Pollination Interactions: From specialization to Generalization*. Chicago: The University of Chicago Press, 99-121.
- Carvalho AT, Schlindwein C. 2011.** Obligate association of an oligolectic bee and a seasonal aquatic herb in semi-arid north-eastern Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society* **102**: 355–368.
- Carvalho AT, Maia ACD, Ojima PY, Santos AA, Schlindwein C. 2012.** Nocturnal bees are attracted by widespread floral scents. *Journal of Chemical Ecology* **38**: 315-318.
- Chen J-M, Chen D, Robert GW, Wang Q-F, Guo Y-H. 2004a.** Evolution of apocarpny in Alismatidae using phylo-genetic evidence from chloroplast rbcL sequence data. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **45**: 33–40.
- Chen J-M, Robert GW, Wang Q-F. 2004b.** Evolution of aquatic life forms in Alismatidae: phylogenetic estimation from chloroplast rbcL sequence data. *Israel Journal of Plant Sciences* **52**: 323–329.
- Chen L, Chen J, Gituru RW, Temam TD, Wang Q. 2012.** Generic phylogeny and historical biogeography of Alismataceae, inferred from multiple DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **63**: 407–416.
- Cook CDK. 1990.** *Aquatic Plant Book*. SPB Academic Publishing. The Haupep. 228p
- Cronquist A. 1981.** *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press.
- Dahlgren RMT. 1975.** A system of classification of the angiosperms to be used to demonstrate the distribution of characters. *Botaniska notiser* **128**: 119-147.
- Daehler CC. 1998.** The taxonomic distribution of invasive angiosperm plants: ecological insights and comparison to agricultural weeds. *Biological Conservation* **84**: 167–180.
- Danforth BN, Fang J, Sipes S. 2006a.** Analysis of family-level relationships in bees (Hymenoptera: Apiformes) using 28S and two previously unexplored nuclear genes: CAD and RNA polymerase II. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **39**: 358–372.
- Danforth BN, Sipes S, Fang J, Brady SG. 2006b.** The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proceedings of the National Academic Science USA* **103**: 15118–15123.
- Darwin C. 1862.** On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effects of intercrossing, London: John Murray.

- Darwin C. 1876.** *The origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. London: John Murray.
- Delpino F. 1868-1875.** Ulteriori osservazione e conziderationi sulla dicogamia nel regno vegetale. *Atti della Societa Italiana di Scienze Naturale in Milano* **11**: 265-332; **12**: 21-141; 17-233.
- Dobson HEM. 1987.** Role of flower and pollen aromas in host-plant recognition by solitary bees. *Oecologia* **72**: 618-623.
- Dobson HEM. 2006.** Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator. In: Dudareva N, Pichersky E, eds. *Biology of floral scent*. Boca Raton: CRC Press, 147–198.
- Dobson HEM, Bergström G. 2000.** The ecology and evolution of pollen odors. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 63–87.
- Dötterl S, Milchreit K, Schöffler I. 2011.** Behavioural plasticity and sex differences in host finding of a specialized bee species. *Journal of Comparative Physiology A Sensory Neural and Behavioral Physiology* **197**: 1119–1126.
- Dötterl S, Füssel U, Jürgens A, Aas G. 2005.** 1,4-Dimethoxybenzene, a Floral Scent Compound in Willows that Attracts an Oligolectic Bee. *Journal of Chemical Ecology* **31**: 2993-2998.
- Dötterl S, Schöffler I. 2007.** Flower scent of floral oil-producing *Lysimachia punctata* as attractant for the oil-bee *Macropis fulvipes*. *Journal of chemical Ecology* **33**: 441–445.
- Dötterl S, Vereecken NJ. 2010.** The chemical ecology and evolution of bee–flower interactions: a review and perspectives. *Canadian Journal of Zoology* **88**: 668–697.
- Ducke A. 1908.** Contribution á la connaissance de la faune hyménoptérologique do Nord-Est du Brasil – II. Hyménoptères récoltés dans l’Etat de Ceará en 1908. *Revue d’Entomologie (Caen)* **27**: 57–87.
- Ducke A. 1910.** Explorações botânicas e entomológicas no Estado do Ceará. *Rev. Trim. Inst. Ceará* **24**: 3-61.
- Engel MS. 2001.** A monograph of the Baltic amber bees and evolution of the Apoidea (Hymenoptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **259**: 1–192.
- Elton CS. 1958.** *The Ecology of Invasions by Animals and Plants*. Methuen, London.
- Esteves FA. 1998.** Fundamentos de Limnologia. 2.Ed. Rio de Janeiro: Interciência, 602p.
- Esteves FA, Camargo AFM. 1986.** Sobre o papel das macrófitas aquáticas na estocagem e ciclagem dos nutrientes. *Acta Limnologica Brasiliensia* **1**: 273-298.
- Faegri K, Van der Pijl L. 1979.** *The principles of pollination Ecology*. Oxford: Pergamon Press.
- Feinsinger P. 1983.** Coevolution and pollination. In: Futuyma DJ, Slatkin M, eds. *Coevolution*. Sinauer, Sunderland, 282-320.

- Gentry AH. 1974.** Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica* **6**: 64–68.
- Gentry AH. 1980.** Bignoniaceae. *Flora Neotropica*, Monograph No. 25(I). The New York Botanical Garden, Bronx, NY, USA.
- Gentry AH. 1992.** Bignoniaceae. *Flora Neotropica*, Monograph No. 25(II). The New York Botanical Garden, Bronx, NY, USA.
- Giurfa M, Nunez J, Chittka L, Menzel R. 1995.** Color preferences of flower-naïve honeybees. *Journal of Comparative Physiology A Sensory Neural and Behavioral Physiology* **177**: 247–259.
- Gottsberger G. 1991.** Pollination of some species of the Carludovicoideae, and remarks on the origin and evolution of the Cyclanthaceae. *Botanische Jahrbücher* **113**: 221-235.
- Grant V, Grant KA. 1979.** Pollination of *Echinocereus fasciculatus* and *Ferocactus wislizenii*. *Plant Systematics and Evolution* **132**: 85–90.
- Grant V, Hurd PD. 1979.** Pollination of the southwestern opuntias. *Plant Systematics and Evolution* **133**: 15–28.
- Greiner B, Narendra A, Reid SF, Dacke M, Ribi WA, Zeil J. 2007.** Eye structure correlates with distinct foraging-bout timing in primitive ants. *Current Biology* **17**: R879-R880.
- Grimaldi D. 1999.** The Co-Radiations of Pollinating Insects and Angiosperms in the Cretaceous *Annals of the Missouri Botanical Garden* **86**: 373-406.
- Grimaldi D, Engel MS. 2005.** *Evolution of the Insects*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Harder LD, Barrett SCH. 2006.** *Ecology and Evolution of Flowers*. Oxford: Oxford University Press.
- Haynes RR, Holm-Nielsen LB. 1989.** Speciation of Alismatidae in the Neotropics. In: Holm-Nielsen LB, Nielsen IC, Balslev H. eds. *Tropical Forest Botanical Dynamics, Speciation and Diversity*. London: Academic Press, 211-219.
- Haynes RR, Holm-Nielsen LB. 1992.** The Limnocharitaceae. *Flora Neotropica* Monographs New York Botanical Garden. New York 56: 1-32.
- Haynes RR, Holm-Nielsen LB. 1994.** The Alismataceae. *Flora Neotropica* Monographs New York Botanical Garden. New York 64: 1-112
- Haynes RR, Les DH, Holm-Nielsen LB. 1998.** Alismataceae. In: Kubitzki, K, (eds.) *The families and genera of vascular plants – Flowering plants monocotyledons Alismatanae and Commelinanae (except Graminae)*. Berlin: Springer-Verlag, 11-15.
- Herrera CM. 1996.** Floral traits and plant adaptation to insect pollinators: a devil’s advocate approach. In: Lloyd DG, Barrett SCH. eds. *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants* Chapman & Hall, New York, p.65-87.

- Hopkins MJG, Fortune Hopkins HC, Sothers CA. 2000.** Nocturnal pollination of *Parkia velutina* by Megalopta bees in Amazonia and its possible significance in the evolution of chiropterophily *Journal of Tropical Ecology* **16**: 733-746.
- Honnay O, Bossuyt B. 2005.** Prolonged clonal growth: escape route of route to extinction? *Oikos* **108**: 427–432.
- Hutchinson J. 1959.** *The families of flowering plants*. Monocotyledons. Oxford.
- Janzen DH. 1968.** Notes on nesting and foraging behavior of Megalopta (Hymenoptera: Halictidae) in Costa Rica. *Journal of the Kansas Entomological Society* **41**: 342-350.
- Janzen DH. 1983.** *Ipomoea trifida* (Churristate, Pudre Oreja, Morning Glory). In: Janzen DH, ed. Costa Rican natural history. Chicago: University of Chicago Press, 262-263.
- Johnson SD, Steiner KE. 2000.** Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Tree* **15**: 140-143.
- Johnson SD, Steiner KE. 2003.** Specialized pollination systems in southern Africa. South Africa *Journal of Science* **99**:345-348.
- Johnson SD 2006.** Pollination-drive sepeciation in plants. In: Harder LD, Barrett SCH ed. Ecology and Evolution of Flowers. Oxford: Oxford University Press, 295-310.
- Kelber A, Warrant EJ, Pfaff M, Wallén R, Theobald JC, Wcislo W, Raguso R. 2006.** Light intensity limits the foraging activity in nocturnal and crepuscular bees. *Behavioral Ecology* **17**: 63-72.
- Knudsen JT, Tollsten L. 1995.** Floral scent in bat-pollinated plants: a case of convergent evolution. *Botanical Journal of the Linnaean Society* **119**: 45–57.
- Knudsen JT, Eriksson R, Gershenzon J, Stahl B. 2006.** Diversity and distribution of floral scent. *Botanical Review* **72** :1–120.
- Kölreuter JG. 1761.** *Vorläufige Nachrichten von einigen das Geschlecht der Pflanzen betreffenden Versuchen und Beobachtungen*. Leipzig: Gleditschischen Handlung.
- Lansac-Tôha FM, Velho LFM, Bonecker CC. 2003.** Influência de macrófitas aquáticas sobre a estrutura da comunidade zooplancônica. In: Thomaz, S.M., Bini, L.M. (Eds.). Ecologia e Manejo de Macrófitas Aquáticas. Eduem, Maringá, 231-242 p
- Larkin LL, Neff JL, Simpson BB. 2008.** The evolution of a pollen diet: Host choice and diet breadth of *Andrena* bees (Hymenoptera: Andrenidae). *Apidologie* **39**: 133-145.
- Larsson M. 2005.** Higher pollinator effectiveness by specialist than generalist flower-visitors of unspecialized *Knautia arvensis* (Dipsacaceae). *Oecologia* **146**: 394–403.
- Lawrence GHM. 1951.** *Taxonomy of vascular plants*. New York: MacMillan Publ. Co.
- Lehtonen S. 2008.** An interative approach to species delimitation in *Echinodorus* (Alismataceae) and the description of two new species. *Kew Bulletin* **63**: 525-563.

- Lehtonen S. 2009.** Systematics of the Alismataceae - A morphological evaluation. *Aquatic Botany* **91**: 279–290.
- Lehtonen S, Myllys L. 2008.** Cladistic analysis of *Echinodorus* (Alismataceae): simultaneous analysis of molecular and morphological data. *Cladistics* **24**: 218–239.
- Les DH, Cleland MA, Waycott M. 1997.** Phylogenetic studies in Alismatidae. II: evolution of marine angiosperms (seagrasses) and hydrophily. *Systematic Botany* **22**: 443–463.
- Li X, Zhou Z. 2009.** Phylogenetic studies on the core Alismatales inferred from morphology and rbcL sequences. *Progress in Natural Science* **19**: 931–945.
- Lindsey AH. 1984.** Reproductive biology of Apiaceae. I. Floral visitors to *Thaspium* and *Zimia* and their importance in pollination. *American Journal of Botany* **71**: 375–387.
- Linsley EG. 1958.** The ecology of solitary bees. *Hilgardia* **27**: 543–599.
- Linsley EG, Macswain JW. 1958.** The significance of floral constancy among of bees of the genus *Diadasia* (Hymenoptera, Anthophoridae). *Evolution* **12**: 219–223.
- Linsley EG, MacSwain JW, Raven PH. 1963a.** Comparative behavior of bees and Onagraceae. I. *Oenothera* bees of the Colorado Desert. *University of California Publications in Entomology* **33**: 1–24.
- Linsley EG, Macswain JW, Raven PH. 1963b.** Comparative behavior of bees and Onagraceae. II. *Oenothera* bees of the Great Basin. *University of California Publications in Entomology* **33**: 25–8.
- Linsley EG, Macswain JW, Raven PH. 1964.** Comparative behavior of bees and Onagraceae. III. *Oenothera* bees of the Mojave Desert, California. *University of California Publications in Entomology* **33**: 59–98.
- Listabarth C. 1996.** Pollination of *Bactris* by *Phyllotrox* and *Epurea*. Implications of the palm breeding beetles on pollination at the community level. *Biotropica* **28**: 69–81.
- Matias LQ. 2007.** O gênero *Echinodorus* (Alismataceae) do domínio da Caatinga brasileira. *Rodriguésia* **58**: 743–774.
- Matias LQ. 2010.** Alismataceae. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB004994>
- Matias LQ, Irgang BE. 2006.** Taxonomy and distribution of *Sagittaria* (Alismataceae) in North-eastern Brazil. *Aquatic Botany* **84**: 183–190.
- Matias L, Sousa DJL. 2011.** Alismataceae no estado do Ceará, Brasil. *Rodriguésia* **62**: 887–900.
- McGinley RJ. 1980.** Glossal morphology of the Colletidae and recognition of the Stenotritidae at the family level. *Journal of the Kansas Entomological Society* **53**: 539–552.
- Melo GAR. 1996.** Two new Brazilian bees of the genus *Protodiscelis* (Hymenoptera, Apoidea). *Revista brasileira de Entomologia* **40**: 97–100.

- Michener CD. 1944.** Comparative external morphology, phylogeny, and a classification of the bees (Hymenoptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **82**: 151–326.
- Michener CD. 1974.** *The Social Behavior of the Bees: A Comparative Study*. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press.
- Michener CD. 1979.** Biogeography of the bees. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **66**: 277–347.
- Michener CD. 2007.** *The bees of the world*. London: The Johns Hopkins University Press.
- Milet-Pinheiro P, Schlidwein C. 2010.** Mutual reproductive dependence of distylic *Cordia leucocephala* (Cordiaceae) and oligolectic *Ceblurgus longipalpis* (Halictidae, Rophitinae) in the Caatinga. *Annals of Botany* **106**: 17–27.
- Milet-Pinheiro P, Ayasse M, Schlindwein C, Dobson HEM, Dötterl S. 2012.** Host location by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee: innate and learned behavior. *Behavioral Ecology* doi:10.1093/beheco/arr219.
- Minckley RL, Roulston TH. 2006.** Incidental mutualisms and pollen specialization among bees. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant–pollinator interaction: from specialization to generalization*. Chicago: University of Chicago Press, 69–98.
- Morgan MT. 2006.** Selection on reproductive characters: conceptual foundations and their extension to pollinator interaction. In: Harder LD, Barrett SCH, eds. *Ecology and evolution of flowers*. New York: Oxford University Press.
- Mori SA, Boeke JD. 1987.** Pollination. Chapter 12 in *The Lecythidaceae of a lowland neotropical forest: La Fumeê Mountain, French Guiana. Memoirs of the New York Botanical Garden* **44**: 137±155.
- Moure JS, Urban D, Melo GAR. 2007.** *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia.
- Müller A. 1996.** Host-plant specialization in western Palearctic anthidiine bees (Hymenoptera: Apoidea: Megachilidae). *Ecological Monographs* **66**: 235–257.
- Müller H. 1873.** *Die Befruchtung der Blumen durch Insekten und die gegenseitigen Anpassungen beider*. Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- Neff JL, Rozen JG. 1995.** Foraging and nesting biology of the bee *Anthemurgus passiflorae* (hymenoptera: Apoidea), descriptions of its immature stages, and observations on its floral host (Passifloraceae). *American Museum Novitates* **3138**: 1–19.
- Neff JL, Simpson BB. 1992.** Bees, pollination systems and plant diversity. In: LaSalle and Gauld, eds. *Hymenoptera and biodiversity*. Wallingford: CAB International, 143–167.
- Niering WA. 1985.** *Wetlands*. The Audubon Society, Nature Guides, New York.
- Ollerton J, Coulthard E. 2009.** Evolution of Animal Pollination. *Science* **326**: 808.

- Pagioro TA, Thomaz SM. 1999.** Influence of the decomposition of *Eichhornia azurea* on selected abiotic limnological variables of different environments of the floodplain of the High Paraná River. *Acta Limnologica Brasiliensia* **11**: 157-171.
- Pansarin ER. 2009.** Reproductive biology of *Echinodorus longipetalus* (Alismataceae): Sexual morphs, breeding system and pollinators. *Aquatic Botany* **89**: 404-408.
- Pansarin ER, Pansarin LM. 2011.** Reproductive biology of *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae): evidence of self-sterility in populations of the state of São Paulo. *Rodriguésia* **62**: 213-221.
- Patiny S, Michez D, Danforth BN. 2007.** Phylogenetic relationships and host-plant evolution within the basalclade of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). *Cladistics* **23**: 1–15.
- Pichon M. 1946.** *Sur les alismatacées et les butomacées*. Notulae systematicae. Paris: Herbarium Du Museum de Paris.
- Pott VJ Pott A. 1997.** Checklist das macrófitas aquáticas do Pantanal, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **11** :215-227.
- Praz CJ, Müller A, Dorn S. 2008a.** Specialized bees fail to develop on non-host pollen: do plants chemically protect their pollen? *Ecology* **89**: 795–804.
- Praz CJ, Müller A, Dorn S. 2008b.** Host recognition in a pollen-specialist bee: evidence for a genetic basis. *Apidologie* **39**:547–557.
- Raguso RA. 2008.** Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Annual Review of ecology and Systematics* **39**: 549–569.
- Raguso RA, Willis MA. 2002.** Synergy between visual and olfactory cues in nectar feeding by naive hawkmoths. *Animal Behavior* **63**: 685–95.
- Ren D, Labandeira CC, Santiago-Blay JA, Rasnitsyn A, Shih C, Bashkuev, A, Logan MAV, Hotton CL, Dilcher D A. 2009.** Probable Pollination Mode Before Angiosperms: Eurasian, Long-Proboscis Scorpionflies. *Science* **326**: 840.
- Richardson DM, Pyšek P. 2008.** Fifty years of invasion ecology – the legacy of Charles Elton. *Diversity and Distributions* **14**: 161 – 168.
- Robertson C. 1899.** Flower Visits of Oligotrophic Bees. *Botanical Gazette* **28**: 215.
- Robertson C. 1925.** Heterotrophic bees. *Ecology* **6**: 412-436.
- Roubik DW. 1989.** *Ecology and natural history of tropical bees*. New York: Cambridge University Press.
- Roulston TH. 1997.** Hourly capture rates of two species of Megalopta (Hymenoptera: Apoidea: Halictidae) at black lights in Panama with notes on nocturnal foraging by bees. *Journal of the Kansas Entomological Society* **70**: 189-196.
- Schiestl F. 2010.** The evolution of floral scent and insect chemical communication. *Ecology* **13**: 643-656.

- 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.
- Schlindwein C. 2004.** Are oligolectic bees always the most effective pollinators? In: Freitas BM, Pereira JOP, eds. *Solitary bees. Conservation, rearing and management for pollination*. Fortaleza: Imprensa Universitária, 231-240.
- Schlindwein C, Martins CF. 2000.** Competition between the oligolectic bee *Ptilothrix plumata* (Anthophoridae) and the flower closing beetle *Pristimerus calcaratus* (Curculionidae) for floral resources of *Pavonia cancellata* (Malvaceae). *Plant Systematics and Evolution* 224: 183–194.
- Schlindwein C, Medeiros PCR. 2006.** Pollination in *Turnera subulata* (Turneraceae): unilateral reproductive dependence of the narrowly oligolectic bee *Protomeliturga turnerae* (Hymenoptera, Andrenidae). *Flora* 201: 178–188.
- Schlindwein C, Wittmann D. 1995.** Specialized solitary bees as effective pollinators of south Brazilian species of *Notocactus* and *Gymnocalycium* (Cactaceae). *Bradleya* 13: 25–34.
- Schlindwein C, Wittmann D. 1997a.** Stamen movements in flowers of *Opuntia* (Cactaceae) favour oligolectic pollinators. *Plant Systematics and Evolution* 204: 179–193.
- Schlindwein C, Wittmann D. 1997b .** Micro-foraging routes of *Bicolletes pampeana* (Colletidae) and bee-induced pollen presentation in *Cajophora archaetae* (Loasaceae). *Botanica Acta* 110: 177–183.
- Schlindwein C, Wittmann D, Martins CF, Hamm A, Siqueira JA, Schiffler D, Machado IC. 2005.** Pollination of *Campanula rapunculus* L. (Campanulaceae): How much pollen flows into pollination and into reproduction of oligolectic pollinators? *Plant Systematics and Evolution* 250: 147-156.
- Sedivy C, Praz CJ, Müller A, Widmer A, Dorn S. 2008.** Patterns of host-plant choice in bees of the genus *Chelostoma*: the constraint hypothesis of host-range evolution in bees. *Evolution* 62: 2487–2507.
- Silveira FA, Melo GAR, Almeida EAB. 2002.** *Abelhas brasileiras. Sistemática e identificação*. Belo Horizonte.
- Sipes SD, Tepedino VJ. 2005.** Pollen-host specificity and evolutionary patterns of host switching in a clade of specialist bees (Apoidea: Diadasiinae). *Biological Journal of the Linnean Society* 86: 487–505.
- Sipes SD, Wolf PG. 2001.** Phylogenetic relationships within Diadasiinae, a group of specialist bees. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 144–156.
- Smith AR., Wcislo WT, O'Donnell S. 2003.** Assured fitness returns favor sociality in a mass-provisioning sweat bee, *Megalopta genalis* (Hymenoptera: Halictidae). *Behavior Ecology and Sociobiology* 54: 14-21.
- Smith AR., Wcislo WT, O'Donnell S. 2008.** Parasites influence body size in the facultatively eusocial bees, *Megalopta* (Hymenoptera: Halictidae): a role in caste determination? *Journal of Insect Behavior* 21: 394–406.

- Soltis DE, Soltis PS, Endress PK, Chase MW. 2005.** *Phylogeny and evolution of angiosperms*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Somanathan H, Borges RM, Warrant EJ, Kelber A. 2008.** Visual ecology of Indian carpenter bees. I. Light intensities and flight activity. *Journal of Comparative Physiology A* **194**: 97-107.
- Song Z, Guo YH, Huang SQ. 2000.** Studies on the breeding system of *Limnocharis flava* (Butomaceae). *Acta Phytotaxonomica Sinica* **38**: 53-9.
- Sprengel CK. 1793.** *Das entdeckte Geheimnis der Natur im Bau und in der Befruchtung der Blumen*. Berlin: Friedrich Vieweg.
- Stebbins GL. 1970.** Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1**: 307-326.
- Takeda AM, Souza-Franco GM, Melo SM, Monkolski A. 2003.** Invertebrados associados às macrófitas aquáticas da planície de inundação do alto rio Paraná (Brasil). In: Thomaz, S.M., Bini, L.M. (Eds.), *Ecologia e Manejo de Macrófitas Aquáticas*. Eduem, Maringá, 243-260p
- Theobald JC, Coates MM, Wcislo WT, Warrant EJ. 2007.** Flight performance in night-flying sweat bees suffers at low light levels. *Journal of Experimental Biology* **210**: 4034-4042.
- Thomaz SM, Bini LM. 2003.** *Ecologia e Manejo de Macrófitas Aquáticas*. Eduem, Maringá.
- Thorne RF. 1976.** A phylogenetic classification of the angiosperms. *Evolutionary Biology* **9**: 35-106.
- Thorp RW. 1979.** Structural, behavioral, and physiological adaptations of bees (Apoidea) for collecting pollen. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **66**: 788-812.
- Thompson JN. 2005.** *The geographic mosaic of coevolution*. Chicago: University of Chicago Press.
- Vazquez DP, Aizen MA. 2004.** Asymmetric specialization: A pervasive feature of plant-pollinator interactions. *Ecology* **85**: 1251-1257.
- Vieira FV, Lima NAS. 1997.** Pollination of *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae). *Aquatic botany* **58**: 89-98.
- Vogel S. 1954.** *Blütenbiologische Typen als Elemente der Sippen-gliederung*. Botanische Studien, Heft 1. Gustav Fischer Verlag, Jena. pp. 338.
- Vogel S. 1969.** Flowers offering fatty oil instead of nectar (Abstract). XI Proceedings of the International Botanical Congress 229.
- Warrant EJ. 2008.** Seeing in the dark: vision and visual behaviour in nocturnal bees and wasps. *The Journal of Experimental Biology* **211**: 1737-1746.
- Warrant EJ, Kelber A, Gislén A, Greiner B, Ribi W, Wcislo WT. 2004.** Nocturnal vision and landmark orientation in a tropical halictid bee. *Current Biology* **14**: 1309-1318.

Waser NM. 2006. Specialization and generalization in plant-pollinator interactions: A historical perspective In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant-Pollination Interactions: From specialization to Generalization*. Chicago: The University of Chicago Press, 3-18.

Waser NM, Chitka L, Prince MV, Williams NM. 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* **77**: 1043–1060.

Waser NM, Ollerton J. 2006. *Plant-Pollination Interactions: From specialization to Generalization*. Chicago: The University of Chicago Press.

Waterhouse BM. 2003. Know your enemy: recent records of potentially serious weeds in northern Australia, Papua New Guinea and Papua (Indonesia). *Telopea* **10**: 477-485.

Wcislo WT, Arneson L, Roesch K, Gonzalez V, Smith A, Fernandez H. 2004. The evolution of nocturnal behavior in sweat bees, *Megalopta genalis* and *M. ecuadoria* (Hymenoptera, Halictidae): an escape from competitors and enemies? *Biological Journal of the Linnean Society* **83**: 377-387.

Wcislo WT, Tierney SM. 2009. Behavioural environments and niche construction: the evolution of dim-light foraging in bees. *Biological Reviews* **84**: 19–37.

Wolda H, Roubik D. W. 1986. Nocturnal bee abundance and seasonal bee activity in a Panamanian forest. *Ecology* **67**: 426-433.

Zanella FCV. 2000. The bees of Caatinga (Hymenoptera, Apoidea, Apiformes): a species list and comparative notes regarding their distribution. *Apidologie* **31**: 579-592.

5. Manuscritos

A seguir seguem manuscritos de quatro artigos, um dos quais já publicado em revista científica internacional. Os manuscritos são apresentados em formato de artigo científico o mais fiel possível às normas de cada revista escolhida, salvo limitações impostas pelo formato de tese. Tabelas e figuras são apresentadas ao final de cada manuscrito.

5.1 Manuscrito

A ser submetido a revista *Annals of Botany*

ARTIGO ORIGINAL

Título

**Abelhas oligoléticas e amplamente poliléticas como polinizadores de *Echinodorus*
(Alismataceae) em alagados temporários da Caatinga, Brasil**

Airton Torres Carvalho^{1*} e Clemens Schlindwein²

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Universidade Federal
da Paraíba, Cidade Universitária, 58059-900 João Pessoa, PB, Brazil

² Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio
Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

Título corrido: Carvalho e Schlindwein- *Polinização de Echinodorus* (Alismataceae)

Autor para correspondência: Airton Torres Carvalho (carvalhoairton@yahoo.com.br)

Com duas tabelas e nove figuras

RESUMO

Conhecimento prévio e objetivos: Interações especializadas entre abelhas oligoléticas, especialistas na coleta de pólen, e plantas aquáticas em ambientes efêmeros como em corpos de água na semi-árida Caatinga do Brasil são raras. A erva aquática *Hydrocleys martii* (Alismataceae) mantém uma interação interdependente com a abelha oligolética *Protodiscelis palpalis* nesses ambientes. Estudamos a polinização da espécie *Echinodorus palaefolius* (Alismataceae) e de outras espécies do gênero que também ocorrem nesses alagados e amostramos visitantes florais ao longo de mais de mil quilômetros na Caatinga com o objetivo de avaliar se também existe uma dependência com polinizadores especializados.

Métodos: O estudo detalhado da biologia floral de *E. palaefolius* foi conduzido em quatro alagados de Pernambuco, Brasil. Polinizações controladas e observações em campo e em jardim experimental foram conduzidas. Determinamos a estabilidade da relação de *Echinodorus* com polinizadores em 41 alagados de seis Estados no semi-árido brasileiro.

Principais Resultados: *Echinodorus palaefolius* tem flores com morfologia simples e recursos em abundância fornecidos aos visitantes florais por um curto e imprevisível período do ano. São autoincompatíveis e dependem de visitas de abelhas para formação de frutos. Ao contrário do esperado, foram visitadas frequentemente por abelhas de apenas três espécies: a oligolética *Protodiscelis alismatis*, e *Apis mellifera* e *Trigona spinipes* ambas espécies amplamente poliléticas. Essa composição de polinizadores foi confirmada nas diferentes regiões da Caatinga.

Conclusões: A interação entre *P. alismatis* e *E. palaefolius* é altamente especializada, semelhante àquela entre *P. palpalis* e *H. martii*. Consideramos *E. palaefolius* menos dependente reprodutivamente do polinizador oligolético do que *H. martii*, porque abelhas amplamente poliléticas poderiam substituí-lo em caso da sua ausência. Entretanto, abelhas de *P. alismatis* foram ausentes apenas em um alagado, revelando a associação com *E. palaefolius* como altamente estável na Caatinga. Além disso, os dados indicam que *P. alismatis* é o principal polinizador de todas as espécies de *Echinodorus* ocorrentes na região semiárida do Brasil.

Palavras-chave: Polinização, *Echinodorus*, Alismataceae, abelhas oligoléticas, especialização, generalização, Caatinga, semiárido, Brasil, *Protodiscelis*, Colletidae.

INTRODUÇÃO

A Caatinga da região semi-árida brasileira é caracterizada por longa estação seca, imprevisibilidade de chuvas e baixa amplitude térmica anual (Andrade-Lima 1981; Sampaio 1995; Prado 2003). Sua vegetação característica é dominada por arbustos, árvores com folhas decíduas e plantas suculentas. Durante o curto período chuvoso, o estrato herbáceo desenvolve-se, rios e riachos intermitentes correm e corpos de água temporários se formam. Esses ambientes alagados abrigam durante um curto período do ano comunidades peculiares de espécies aquáticas ilhadas (Maltchik e Pedro 2001; Maltchik e Medeiros 2006). Sua formação e duração depende essencialmente do volume de água precipitada que é, contudo, altamente imprevisível entre anos (Maltchik 1999).

Macrófitas da família Alismataceae *sensu lato* (incluindo Limnocharitaceae) (APGIII 2009) são elementos comuns em ambientes aquáticos na caatinga (Haynes e Holms-Nielsen 1992; 1994; Matias 2007; 2010, Matias e Irgang 2006; Matias e Soares 2011). Representantes de cinco gêneros de Alismataceae ocorrem em áreas alagadas na caatinga: *Sagittaria* (4 spp.) (Matias e Irgang 2006; Matias 2010), *Echinodorus* (10 spp.) (Matias 2010), *Helanthium* (uma espécie) (Matias 2007; Matias 2010), *Limnocharis* (1 spp.) (Haynes e Holm-Nielsen 1992; Matias e Soares 2011) e *Hydrocleys* (3 spp.) (Haynes e Holm-Nielsen 1992). Todas essas espécies apresentam flores caracteristicamente melitófilas, embora pouco seja conhecido sobre sua ecologia.

Nos alagados efêmeros da Caatinga, habitat natural dessas espécies aquáticas de Alismataceae, interações com polinizadores especializados e autoincompatibilidade genética não são esperadas, uma vez que r-estrategistas são mais comuns a esses ambientes (Baker 1974; Johnson e Steiner 2000). Inesperadamente, foi demonstrada interdependência reprodutiva entre abelhas da espécie *Protodiscelis palpalis* (Colletidae, Neopasiphaeinae) e a erva aquática *Hydrocleys martii* em alagados

temporários da Caatinga (Carvalho e Schlindwein 2011). *Protodiscelis palpalis* é estreitamente oligolética (veja Robertson 1925; Cane e Sipes 2006) nessas plantas, o que significa que as fêmeas alimentam as crias exclusivamente com pólen de *Hydrocleys* (Carvalho e Schlindwein 2011).

Abelhas do gênero *Protodiscelis* foram documentadas como oligoléticas em *Alismataceae sensu lato* (Melo 1996; Vieira e Lima 1997; Carvalho e Schlindwein 2011). Abelhas da espécie *Protodiscelis echinodori* foram os polinizadores mais frequentes de *Echinodorus grandiflorus* (sinônimo de *Echinodorus grandiflorus* subsp. *grandiflorus*) e *Echinodorus floribundus* (sinônimo de *Echinodorus grandiflorus* subsp. *aureus* (Vieira e Lima 1997; ver Lehtonen 2008) no Cerrado de Minas Gerais. Além disso, indivíduos dessa espécie também foram documentados como visitantes florais de *E. grandiflorus* em São Paulo (Pansarin e Pansarin 2011). Machos e fêmeas de *Protodiscelis alismatis* até agora foram exclusivamente coletados em flores de *Echinodorus* (Alismataceae) (Ducke 1908; 1910; Zanella 2000; Carvalho e Schlindwein 2011) no nordeste do Brasil.

Estudamos a polinização de *Echinodorus palaefolius* (Ness e Mart) J.F. Macbr., uma espécie endêmica do nordeste do Brasil (Haynes e Holm-Nielsen 1994; Lehtonen 2008) e perguntamos: qual a sua biologia reprodutiva e quais são seus visitantes florais e polinizadores efetivos? Qual o papel de *Protodiscelis alismatis* como polinizador da espécie? Qual é a distribuição geográfica das relações entre *Echinodorus* e seus polinizadores na Caatinga? Existe dependência entre os parceiros?

MATERIAIS E MÉTODOS

Espécie estudada

Echinodorus palaefolius apresenta distribuição restrita à porção oriental do Brasil

(Haynes e Holm-Nielsen 1994; Matias 2007; Lehtonen 2008). Trata-se de uma planta aquática com folhas emersas de tamanho e forma variáveis (de arredondada a ovalada), com tricomas simples e pecíolo semicircular (Matias 2007; Lehtonen 2008). Marcas translúcidas na região pelúcida da folha são, quando presentes, de difícil visualização. As inflorescências são racemosas paniculiformes com numerosas flores aproximadamente triangulares de pétalas brancas dispostas em vários verticílios. Doze estames dorsifixos com anteras de deiscência rimosa circundam os numerosos carpelos livres, fixados em um receptáculo semicircular. Os frutos são aquênios. As sépalas são persistentes e protegem o fruto em desenvolvimento. A espécie é comum no Nordeste do Brasil e cresce principalmente em alagados rasos efêmeros ou na margem de rios intermitentes.

Local do estudo

A biologia reprodutiva de *E. palaefolius* foi estudada detalhadamente em quatro alagados efêmeros da micro-bacia hidrográfica do Riacho da Luíza, bacia do Rio Ipanema, afluente do Rio São Francisco. Dois dos alagados localizam-se no Município de Venturosa, localidade “Carrapateira” (8° 36'41" S, 36 ° 51'24" W, 560m) e dois no município de Pedra, localidade “Fazenda Gentio” (8°39' S, 36 ° 52'22" W, 540m), Estado de Pernambuco, Brasil. A região é caracterizada por apresentar remanescentes de cobertura original de Caatinga arbórea inseridos em amplas áreas de pastagem com arbustos, resultado de atividade de pecuária. A precipitação média anual é de 550 mm, dos quais mais de 80% se concentram entre fevereiro e abril. A temperatura média anual é de 22,9° C (CPTEC 2012).

Cinquenta indivíduos removidos desses alagados foram replantados em aquários e acondicionados em um jardim experimental localizado no Meliponário do Senhor Rodrigo Otávio Carvalho, município de Camaragibe, Pernambuco, para coleta de dados

adicionais. Aquários de 50 ℓ preenchidos com 20 ℓ de uma mistura de 1:1 de areia lavada e terra vegetal foram usados como substrato de replantio. Um ou dois indivíduos foram acondicionados por aquário. A região onde se localiza o jardim experimental apresenta vegetação semi-natural de Floresta Atlântica, com presença de plantas frutíferas e ornamentais cultivadas. Localmente não ocorrem espécies do gênero *Protodiscelis* (Carvalho e Schlindwein 2011).

Morfologia, antese, número de flores e fenologia

A descrição detalhada da morfologia floral e contagens de flores e partes florais foram obtidas a partir de flores e inflorescências frescas no campo e/ou oriundas de indivíduos replantados. Trinta inflorescências foram medidas e em 100 indivíduos foi determinada a quantidade de ramificações laterais (verticílios). A longevidade das inflorescências foi determinada a partir de 15 racemos marcados no campo.

O decorrer da antese floral foi acompanhado em 10 inflorescências, das quais cinco foram ensacadas para verificação do horário de abertura e longevidade das flores não visitadas e visitadas, totalizando 58 flores observadas. A receptividade estigmática foi verificada com peróxido de hidrogênio e permanganato de potássio (Kearns e Inouye 1993).

Para a verificação do número de flores produzidas por dia, 150 inflorescências foram marcadas aleatoriamente e o número de flores abertas foi contado. O número total de flores produzidas por inflorescência foi determinado a partir de 11 plantas escolhidas ao acaso. Foi contado o número de frutos, pedicelos, flores abertas e botões florais.

A fenologia de *E. palaefolius* foi determinada nos alagados em Pedra e Venturosa através de observações mensais durante dois anos. A intensidade de floração foi estimada visualmente em uma escala arbitrária de 0 a 100% dividida por quatro e por fotografias tiradas do alagado. Os dados de pluviosidade mensal no município de

Pedra durante os dois anos de monitoramento de fenologia foram adquiridos em CPTEC (2012).

Razão pólen/óvulo e volume de néctar

O número de grãos de pólen por flor foi determinado a partir de 15 botões florais fixados em álcool 70%, oriundos de diferentes indivíduos. As anteras foram removidas e maceradas dentro de tubos tipo Eppendorf, aos quais foi adicionado 0,5 ml de ácido láctico glicerinado 3:1. Após homogeneização em agitador vortex, alíquotas da solução foram contadas em câmara de Neubauer. O número de carpelos e anteras por flor foi determinado a partir de 50 flores observadas sob estereomicroscópio. A partir das contagens realizadas foi determinada a razão pólen/óvulo.

O volume de néctar foi medido em 60 flores de 25 inflorescências previamente ensacadas. A partir do início da antese, dez flores de diferentes inflorescências eram removidas a cada hora, entre as 7:00 e 12:00 h, e o volume de néctar medido com auxílio de microcapilar de 0,5 µl de volume fixo (minicaps, Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt, Alemanha). O volume foi determinado pela multiplicação do comprimento total da coluna do microcapilar pelo comprimento da coluna de néctar, dividido pelo volume do capilar.

Sistema reprodutivo e frutificação natural

Em inflorescências previamente ensacadas foram realizados testes para verificação do sistema reprodutivo. Em flores marcadas foram feitos os experimentos de autopolinização manual ($N=90$), autopolinização geitonogâmica ($N=30$) e polinização manual cruzada ($N=75$), no qual flores foram polinizadas com pólen de outros indivíduos, distantes no mínimo 15 m. Para verificação da formação espontânea de frutos, dois experimentos foram realizados: 110 botões florais foram marcados e ensacados sem manipulação; 30 inflorescências jovens sem nenhuma flor aberta foram

somente ensacadas e não mais manipuladas. Após 30 dias do início dos experimentos foi contado o número de pedicelos (em caso de flores caídas, sem formar frutos); no total, 1.291 flores foram monitoradas.

O sucesso reprodutivo de *E. palaefolius* foi medido em condições naturais nos alagados da Fazenda Gentio e da Carrapateira (205 botões) e no jardim experimental de Camaragibe (90 botões). Para tal, flores acessíveis aos visitantes florais foram marcadas com linha de costura. Em condições naturais, as flores eram visitadas por *Protodiscelis alismatis* e outras abelhas (ver resultados) enquanto que no jardim experimental as flores foram visitadas por *Trigona spinipes*, *Plebeia* cf. *flavocincta*, *Plebeia* sp. (grupo *minima*), *Partamona* cf. *litoralis* (Apidae, Meliponini) e *Dialictus* sp. (Halictidae, Halictini).

Nos experimentos com flores marcadas, alguns frutos e pedicelos não puderam ser recuperados nos alagados. Para todos os experimentos, o número de aquênios foi contado discernindo aqueles com semente desenvolvida dos demais.

Comportamento e frequência de visitantes florais

A frequência de visitantes florais foi determinada a partir de 60 flores observadas durante 30 min por hora durante três dias não consecutivos por três observadores. Os dados foram coletados em dois alagados, um em Pedra outro em Venturosa, em agosto de 2009. Na contagem de visitas foi registrado se os insetos coletaram néctar e/ou pólen, discernindo entre machos e fêmeas. O comportamento dos visitantes foi filmado para análise em câmera lenta.

Machos de *P. alismatis* foram marcados individualmente no mesossoma com caneta Edding 480 e observados por três dias em agosto de 2009. A frequência de patrulha de machos foi determinada em seis inflorescências, através da contagem de sobrevoos em flores.

Além disso, visitantes florais de espécies de *Echinodorus* foram coletados em outros 41 alagados temporários em seis estados do Nordeste do Brasil, no período compreendido entre fevereiro de 2008 e outubro de 2009 (ver Tabela 2; Fig. 1). Cada alagado foi inspecionado por duas horas por uma manhã, quando foram coletados os visitantes florais com rede entomológica para determinar o espectro dos visitantes e a espécie visitante predominante. Amostras das plantas foram herborizadas e identificadas com auxílio de chaves de identificação para as espécies do gênero (Haynes e Holm-Nielsen 1994; Matias 2007; 2010; Lehtonen 2008).

RESULTADOS

Morfologia, antese e recursos florais

Echinodorus palaefolius é uma erva robusta com até 80 cm de altura. As flores em forma triangular são brancas e dispostas em inflorescências paniculiformes (Fig. 2 A). O comprimento das inflorescências varia entre 40 – 170 cm (média = 0,83, dp = 35 cm; n = 30). Formam até quatro ramificações laterais (verticílios), mas a maioria (69%) somente apresenta flores diretamente nos eixo laterais (n = 100). As flores são hermafroditas com androceu formado por 12 estames dorsifixos (n = 50) (Fig. 2 C e D). O gineceu é formado por $110,2 \pm 21,7$ carpelos (máximo 158; mínimo 75; n = 50) afixados em um receptáculo semicircular com ápice acuminado. Cada carpelo geralmente porta um óvulo, havendo esporadicamente a presença de um segundo óvulo rudimentar. O estigma localiza-se no ápice acuminado do carpelo e as anteras são expostas lateralmente.

As flores abriram lentamente entre 5:30 e 7:00 hs e fecharam entre 13:30 e 14:00 hs, tendo assim uma longevidade entre sete e oito horas. Flores na mesma inflorescência abriram no mesmo horário, entretanto, o horário de abertura varia entre indivíduos (n=10). Na ausência de visitação, as flores permaneceram abertas por uma hora mais.

Na abertura das flores, os estigmas já foram receptivos, mas as anteras ainda estiveram fechadas (Fig. 2 D). Essas abriram e apresentaram os grãos de pólen somente após de um toque mecânico. Depois das 10:00 H as anteras abriram sem estímulo mecânico. Após a primeira visita de uma abelha antes desse horário, todas as anteras abriram.

A flor apresenta três nectários localizados na base das sépalas, onde também se acumula o néctar (Fig. 2 B). As flores observadas mantiveram produção contínua de néctar por toda antese. A média do volume de néctar acumulado por flor ao fim da antese foi de 0,26 μ l (dp = 0,05 μ l, n = 10) (Fig. 3). Os grãos de pólen são pantoporados, pequenos e esferoidais, com diâmetro médio de 20,0 μ m (dp = 1,2 μ m; n = 20). Cada flor produziu em média 225.312 grãos de pólen (dp = 43.659; n = 15).

A longevidade das inflorescências variou entre 18 e 45 dias (n = 15). Em média, cada inflorescência disponibilizou 7,6 flores por dia (dp = 6,5; mínimo = 0; máximo = 38; n = 150) e produziu 241,8 flores ao longo do período de floração (dp = 101,2; mínimo = 109; máximo = 406; n = 150).

A fenologia da população estudada foi regida pelo nível e presença de água nos alagados. Em 2008, a população iniciou a floração na segunda metade de março e permaneceu florada até a segunda metade do mês de agosto, tendo pico de floração na primeira metade de julho. Em 2009, a população apenas começou a florescer na segunda metade de maio, atingiu o pico de floração na primeira quinzena de agosto e somente finalizou a floração em novembro (Fig. 4). Nos dois anos de observação, a população de *E. palaefolius* no município de Pedra apresentou um pico de floração que se estabeleceu cerca de 120 dias após o mês mais chuvoso do ano. As plantas permaneceram verdes até que o alagado estivesse totalmente seco, o que ocorreu no mês de setembro em 2008 e novembro em 2009. Com a estiagem, as folhas dos indivíduos no alagado seco murcharam, embora as inflorescências tenham permanecido eretas. Os

201 aquênios foram liberados com movimento das inflorescências secas ao vento. O rizoma
202 de *E. palaefolius* pode se manter viável até a estação chuvosa seguinte, entretanto,
203 várias novas plântulas foram observadas a cada nova estação. Observações no jardim
204 experimental mostraram que plantas adultas permaneceram vivas por todo o período de
205 observação (dois anos), desde que o nível da água dos aquários fosse mantido estável (n
206 = 5). Em aquários que foram esvaziados, as folhas e caules murcharam após oito a doze
207 dias. Reidratados após dois meses, os rizomas rebrotaram novamente ($n = 5$).

208 *Sistema reprodutivo*

209 As populações estudadas de *E. palaefolius* foram autoincompatíveis (Tab. 1). Das 83
210 flores autopolinizadas manualmente, somente cinco formaram frutos que portaram em
211 média apenas $4,4 \pm 2,6$ (DP) aquênios. Não houve formação de frutos através de
212 polinização geitonogâmica e somente uma entre 1.291 flores ensacadas desenvolveu um
213 fruto. A taxa de frutificação foi muito alta após polinização cruzada manual (99%), com
214 produção média de 115 ± 21 (DP) aquênios por flor (Tab. 1). A taxa de frutificação
215 observada em flores acessíveis aos visitantes florais foi alta, com o número de aquênios
216 formados por fruto semelhante àquele das flores cruzadas manualmente (Tab. 1).

217 Fêmeas de *P. alismatis* pousaram no centro da flor e a cada visita coletaram néctar
218 nos três nectários. Durante a visita, descreveram um movimento circular caracterizado
219 por três paradas, a cada 120° de ângulo deslocado, o que coincide com a posição dos
220 nectários das flores. Durante toda a visita floral, as fêmeas bateram o metassoma nas
221 anteras em alta frequência, coletando o pólen e produzindo um som audível. Os grãos de
222 pólen ficaram aderidos nos pêlos extremamente plumosos localizados nos externos do
223 metassoma, coxas e fêmures das pernas posteriores das fêmeas. Em flores com anteras
224 fechadas, no início da antese, o toque mecânico das abelhas nas anteras provocou a
225 abertura das tecas.

As operárias de *T. spinipes* pousaram nas pétalas, deslocaram-se até o centro da flor e tomaram néctar em um dos nectários. Depois coletaram pólen com as pernas anteriores e mandíbulas e pairaram no ar repetidamente para transferir os grãos de pólen para as corbículas das pernas posteriores. As operárias de *Apis mellifera* mostraram comportamento semelhante, entretanto, transferiram os grãos para as corbículas mais frequentemente quando ainda pousadas nas flores. Por vezes foi observado que operárias de *T. spinipes* coletaram e transferiram anteras inteiras para as corbículas.

Os machos de *P. alismatis* patrulharam as flores em busca de fêmeas co-específicas. Várias cópulas foram observadas nas flores de *E. palaefolius*. Os machos seguiram rotas de patrulha e verificaram visualmente as flores nas inflorescências da base para o ápice, sem pousar nas flores. A patrulha foi mais intensa no início da antese (Fig. 7). Os machos visitaram flores em busca de néctar, principalmente no início da antese (entre 7:30 – 8:30h). Vários deles foram observados com a parte ventral do corpo coberta de grãos de pólen. Ao se alimentarem de néctar, os machos apresentaram comportamento semelhante às fêmeas, embora não movimentassem o metassoma tal como elas. Ao tocarem as anteras com as pernas e metassoma, os machos de *P. alismatis* provocaram a abertura das anteras. Normalmente, após uma visita em flores com anteras ainda fechadas, todas as tecas abriram-se.

No jardim experimental em Camaragibe, onde não haviam indivíduos de *P. alismatis*, as flores de *E. palaefolius* foram intensamente visitadas por *Trigona spinipes*, *Plebeia* cf. *flavocincta*, *Pl.* sp. (grupo *minima*), *Partamona* cf. *litoralis* (Meliponini) e *Dialictus* sp. (Halictidae). As flores foram visitadas em média 22 vezes (dp = 4,8; n = 17). Os visitantes mais frequentes foram *T. spinipes* e *Pl. flavocincta*. No jardim experimental, foi observada uma taxa de frutificação de 58% e um número médio de 85 aquênios por flor (dp = 6) (Tab. 1).

251 *Visitantes florais*

252 Abelhas de cinco espécies visitaram as flores de *E. palaefolius* em Pedra e
253 Venturosa. Abelhas de *Protodiscelis alismatis* foram os visitantes florais mais
254 frequentes, seguido de operárias de *Apis mellifera* e *Trigona spinipes* (Apidae) (Fig. 5).
255 Abelhas de *Dialictus* sp. (Halictidae) e *Plebeia* cf. *flavocincta* (Apidae) visitaram as
256 flores somente esporadicamente. Em média, cada flor foi visitada 30 vezes durante a
257 antese (dp = 12; n = 20). Abelhas de *P. alismatis* foram responsáveis por 81% das visitas
258 florais (Fig. 5). O pico de visitação ocorreu entre 10:00 – 10:30h e cerca de 30% de
259 todas as visitas deram-se nesse horário (Fig.6).

260 *Visitantes florais de espécies de Echinodorus em outros alagados da Caatinga*

261 Foram coletadas seis espécies do gênero *Echinodorus* nos 41 alagados
262 inspecionados. A espécie mais comum foi *E. palaefolius*, encontrada em 61% dos
263 alagados, seguida de *E. subalatus* (Mart.) Griseb. (32%). Plantas de *E. pubescens*
264 (Mart.) Seub. ex Warm., *E. glandulosus* Ratja, *E. cf. paniculatus* Micheli e de uma outra
265 espécie não identificada (*Echinodorus* sp.) foram encontradas somente uma vez. Em
266 apenas dois alagados foram encontradas populações sintópicas de duas espécies de
267 *Echinodorus*: em Jacobina do Piauí – *E. cf. pubescens* e *E. subalatus*; e em um dos
268 alagados de Pedra – *E. subalatus* e *E. palaefolius* (Tab. 2).

269 Abelhas de apenas cinco espécies, as mesmas registradas nos alagados de Pedra e
270 Venturosa, foram também encontradas visitando as flores de outras espécies de
271 *Echinodorus* em alagados por uma ampla faixa da Caatinga: *Protodiscelis alismatis*,
272 *Trigona spinipes*, *Apis mellifera*, *Plebeia* cf. *flavocincta* e *Dialictus* sp. Em flores de
273 todas as espécies de *Echinodorus* foram registrados abelhas de *P. alismatis*. Em 39 dos
274 alagados (95% do total), as abelhas de *P. alismatis* foram os visitantes florais mais
275 abundantes. Nos dois alagados restantes, operárias de *A. mellifera* foram os únicos

visitantes. Operárias de *T. spinipes* e *A. mellifera* foram amostradas em 76% e 71% dos alagados, respectivamente. Em 60% dos alagados *P. alismatis*, *T. spinipes* e *A. mellifera* foram amostrados sintopicamente e em mais da metade dos alagados (54%), essas três espécies foram visitantes exclusivos de *Echinodorus* (Fig. 8, 9).

As flores das outras espécies de *Echinodorus* foram visitadas pelas mesmas espécies de abelhas registradas em *E. palaefolius*. Também nessas flores, abelhas de *Protodiscelis alismatis* foram os visitantes florais mais abundantes (Tab. 2).

DISCUSSÃO

Echinodorus palaefolius e *Protodiscelis alismatis* interagem num sistema especializado de polinização?

Observamos nas populações de *Echinodorus palaefolius* em ambientes efêmeros uma interação com polinizadores que se insere nos dois extremos das discussões sobre especializações e generalizações em sistemas de polinização (Waser e Ollerton 2006). Enquanto abelhas de *Protodiscelis alismatis* são estreitamente oligoléticas, especialistas em pólen de flores de *Echinodorus* (que também às visitam como fonte de néctar), operárias das duas outras espécies visitantes florais de *Echinodorus* são amplamente poliléticas (Cane e Sipes 2006) e mostram inúmeras relações com espécies de plantas onde coletam recursos (Robertson 1925; Ramalho 2004; Michener 2007). Em estudos de interações entre abelhas e plantas, *Apis mellifera* e *Trigona spinipes* são espécies que normalmente apresentam relações com 30% ou mais das espécies melitófilas de um dado local (Almeida e Laroca 1988; Aguiar *et al.* 1995; Schlindwein 1998; Wilms 1995, Alves-dos-Santos 1999, Aguiar 2003, Schlindwein 2004).

É surpreendente que a mesma composição de três espécies de visitantes florais de *Echinodorus* – a especialista *P. alismatis* e as generalistas *Apis mellifera* e *Trigona spinipes* – tenha mostrado tamanha consistência na região semiárida do Brasil,

repetindo-se na maioria dos alagados temporários investigados em ampla faixa de distribuição na Caatinga. Interações semelhantes também foram documentadas para duas espécies de *Echinodorus* no Cerrado, entretanto, o polinizador oligolético nesse caso foram abelhas de uma espécie cogenérica, *P. echinodori* (Vieira e Lima 1997).

Outra espécie do gênero, *Protodiscelis palpalis*, interage com *Hydrocleys martii* num sistema altamente especializado de polinização na Caatinga (Carvalho e Schlindwein 2011). *Hydrocleys martii* ocorre nos mesmos alagados temporários que *Echinodorus* na Caatinga. As associações *H. martii*/*P. palpalis* e *Echinodorus*/*P. alismatis* são muito semelhantes e caracterizam-se por a) predominância de visitas florais de espécies oligoléticas de abelhas, b) alta sincronização fenológica e visitas dos polinizadores duração o início da antese, c) visitas florais dos machos já antes ou logo no início da antese e patrulhas de machos nas flores com inspeções florais sem visitas, d) flores são locais de acasalamento, e) abelhas de *Protodiscelis* são polinizadores efetivos e f) as fêmeas coletam pólen e néctar.

As flores de *Hydrocleys martii*, diferentemente daquelas de *Echinodorus*, possuem uma câmara de pólen formada por estaminódios que circundam os estames férteis e os nectários. Os grãos de pólen e o néctar na câmara são acessíveis somente a abelhas de *Protodiscelis palpalis* e, desta maneira, formam um filtro que exclui as demais espécies de abelhas. Desta forma, existe interdependência reprodutiva nessa associação (Carvalho e Schlindwein 2011). Carente de estaminódios protetores, as flores de *Echinodorus* apresentam morfologia simples. Os recursos florais são abundantes e de fácil acesso para todos os potenciais visitantes florais. Nosso estudo mostra, inesperadamente, que o espectro dos visitantes de *E. palaefolius* e das outras espécies de *Echinodorus* é muito pequeno nos alagados temporários da Caatinga. As outras duas espécies encontradas nas flores de *Echinodorus*, *Apis mellifera* e *Trigona*

spinipes, devem ser as abelhas mais comuns e hoje mais amplamente distribuídas no Brasil (Silveira *et al.* 2002). Entre as espécies altamente eussociais, são as que apresentam o maior número de operárias por colônia (Michener 1974; 2007). Operárias de *A. mellifera* e *T. spinipes* recorrem a diversas plantas em sua dieta alimentar, inclusive as flores de *Echinodorus*, ainda que em visitas quantitativamente pouco expressivas. Como as operárias de *Apis mellifera* e *Trigona spinipes* também são polinizadores efetivos das flores de *Echinodorus*, estima-se uma redução da dependência reprodutiva dessas plantas à presença de *P. alismatis*. A ausência de *Protodiscelis alismatis* não diminui expressivamente a capacidade de reprodução sexuada das plantas. A espécie oligolética de abelha, contudo, depende reprodutivamente das suas plantas hospedeiras, o que é comum nessas relações de oligoetia (Minckley e Roulston 2006). O sistema de polinização de *Echinodorus* entretanto é generalista.

Não sabemos por que outras espécies de abelhas não visitam as flores de *Echinodorus*. Talvez a presença maciça das abelhas oligoléticas em sincronia com a abertura das flores de *Echinodorus* acarrete na remoção rápida de pólen, como demonstrado para *Hydrocleys martii* (Carvalho e Schlindwein 2011), o que tornaria essas flores pouco atraentes para outras abelhas. As flores de *Echinodorus* também poderiam apresentar atributos florais ainda não identificados que poderiam excluir outros visitantes florais, tal como odores detereentes (Schiestl *et al.* 2011). Talvez exista proteção química do pólen de *Echinodorus* com compostos do metabolismo secundário, como foi proposto por Praz *et al.* (2008) para sistemas de polinização com abelhas oligoléticas; estas teriam a capacidade fisiológica de conviver com estes compostos tóxicos o que favoreceria a abelha oligolética e excluiria outras espécies para coleta de pólen.

351 *Avaliação da oligoetia em P. alismatis*

352 Em praticamente todos os alagados temporários examinados, bem como em flores
353 de todas as cinco espécies de *Echinodorus* investigadas, abelhas de *P. alismatis*
354 apresentaram-se como polinizadores efetivos. Infelizmente, não encontramos
355 populações das seis outras espécies de *Echinodorus* citadas para a Caatinga (Matias
356 2008; 2010, Matias e Soares 2011), pois seria interessante verificar se *P. alismatis*
357 também ocorre nas flores dessas espécies. Assim, *P. alismatis* seria a única espécie
358 oligolética polinizadora de todas as espécies do gênero na região do semiárido
359 brasileiro. Acreditamos que isto é o caso, considerando a ampla distribuição geográfica
360 da associação *P. alismatis/Echinodorus* amostrada (alagados temporários de seis estados
361 do Nordeste do Brasil, distantes mais de mil quilômetros).

362 Abelhas de *P. echinodori* foram amostradas em flores de espécies de *Echinodorus*
363 no Cerrado e na Mata Atlântica do Brasil (Vieira e Lima 1997; Pansarin 2009; Pansarin
364 e Pansarin 2011), e aparentemente substituem *P. alismatis* nesses ecossistemas. Seria
365 interessante determinar as relações entre espécies de Alismataceae (especialmente
366 *Echinodorus*) e *Protodiscelis* no sul do Brasil, na Argentina, no Paraguai, no Pantanal e
367 na Amazônia, a fim de entender os padrões de distribuição biogeográfica e o histórico
368 dessas relações altamente especializadas. Visitantes de espécies de *Sagittaria* também
369 devem ser amostradas com o mesmo fim, embora seja conhecido que espécies desse
370 gênero são polinizadas por várias espécies de insetos não especializados (*e.g.*
371 (Muenchow e Delesalle 1994).

372 Baker (1974) postulou que plantas de vida curta e que habitam ambientes
373 temporários são geralmente autogâmicas e/ou perderam a necessidade de polinização
374 biótica. Espécies que vivem em ambientes aquáticos efêmeros, como os alagados da
375 Caatinga, apresentam ampla variação do tamanho das populações e altas taxas de

extinção local, como comprovado para *Eichhornia paniculata* (Barrett e Husband 1997). Algumas espécies que habitam alagados temporários, contudo, apresentam autoincompatibilidade e dependência a polinizadores (Barrett e Husband 1997; Alves-dos-Santos 2002; Alves-dos-Santos e Wittmann 1999; 2000). Nos alagados temporários da Caatinga, a tenacidade das abelhas oligoléticas de *P. palpalis* em flores de *H. martii* (Carvalho e Schlindwein 2011), bem como de *P. alismatis* em flores de *Echinodorus* spp. demonstra que sistemas de polinização que envolvem abelhas oligoléticas são estáveis nesse tipo de ambiente. Em alguns outros ambientes altamente sazonais com características semelhantes, como semidesertos e estepes, o número de abelhas oligoléticas é maior que o observado em áreas pouco sazonais (Feinsinger 1983 e citações nesse trabalho)

As populações das diferentes espécies de *Echinodorus* nos alagados temporários são caracterizadas pela alta densidade das plantas, que durante a floração fornecem recursos florais em abundância às abelhas. O período de atividade de voo de *P. alismatis* é altamente sincronizado com a floração de *Echinodorus*, característica comum em abelhas oligoléticas (Linsley 1958; Feinsinger 1983; Cane e Sipes 2006). Na Caatinga onde o período de chuva pode variar, a umidade de solo após as primeiras chuvas fortes, deve sincronizar a emergência das abelhas com a floração de *Echinodorus*, que inicia cerca de três semanas após a reconstituição das populações nos alagados temporários ressurgidos. As coletas de abelhas realizadas em flores de outras espécies de plantas no entorno dos alagados antes da floração de *Echinodorus*, na época de crescimento vegetativo desta espécie e ao final de sua floração, não resultaram em capturas de *P. alismatis*.

Nas espécies estudadas de *Echinodorus* notamos que as anteras permaneceram fechadas durante as primeiras três horas da antese, mas disponibilizaram os grãos de

pólen após um toque mecânico, mesmo antes desse período. Esta indução da oferta de pólen pode ser um fenômeno geral do gênero, cujas espécies apresentam morfologia floral bastante uniforme (Leherton 2008; Pansarin 2009). Abertura de flores com anteras fechadas também foi observada em outras espécies de *Echinodorus* (Vieira e Lima 1997; Pansarin 2009; Pansarin e Pansarin 2011), porém não foi mencionado se a deiscência das anteras foi relacionada às primeiras visitas florais. Machos de *P. alismatis*, geralmente, são os primeiros visitantes florais e responsáveis pelo estímulo da abertura das anteras em quase todas as flores. Esta característica pode estar associada à estratégia de acasalamento dos machos que visitam as flores com frequência somente no início da antese (Carvalho *et al.* dados não publicados). Durante os intensos voos de patrulha na busca de fêmeas, os machos geralmente inspecionam as flores, embora raramente as visitam durante as patrulhadas. Entretanto no início da antese os machos mostram fluxo intenso entre as numerosas flores em sua busca por néctar. Sendo assim é provável que desempenhem papel importante na polinização cruzada (Alves-dos-Santos 2002) também em espécies de *Echinodorus*, já que ao provocarem a abertura das anteras ficam com a parte ventral do corpo repleto de grãos de pólen.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Antônio de Brito Tenório e Leniro Tenório Vaz pelo apoio logístico no trabalho de campo. A Davi Jamelli, Gabriel Lira e Telton Ramos pela ajuda no trabalho de campo. Esse trabalho foi desenvolvido com recursos do CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) e Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Brasil. Licença de coleta ICMBio N° 12737-1.

LITERATURA CITADA

- Alves-dos-Santos I. 2002.** Machos de abelhas oligoléticas como polinizadores eficientes. In: *Anais do Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto*. 5, 136-140
- Alves-dos-Santos I, Wittmann D. 2000.** Legitimate pollination of the trimorphic

- 427 flowers of *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) by *Ancyloscelis gigas* bees
428 (*Anthophoridae*, Apoidea). *Plant Systematic e Evolution* **223**: 127-137.
- 429 **Alves-dos-Santos I, Wittmann, D. 1999.** The proboscis of the long-tongued
430 *Ancyloscelis* bees (*Anthophoridae*/Apoidea), with remarks on flower visits e pollen
431 collecting with the mouth parts. *Journal of the Kansas Entomological Society* **72**: 253-
432 264.
- 433 **Aguiar CML. 2003.** Utilização de recursos florais por abelhas (Hymenoptera, Apoidea)
434 em uma área de caatinga (Itatim, Bahia, Brasil). *Revista Brasileira de Zoologia* **20**: 457-
435 467.
- 436 **Aguiar CML, Martins CF, Moura, ACC. 1995.** Recursos florais utilizados por
437 abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em área de Caatinga (São João do Cariri, Paraíba).
438 *Revista Nordestina de Biologia* **10**: 101-117.
- 439 **Almeida MC, Laroca S. 1988.** *Trigona spinipes* (Apidae, Meliponinae): Taxonomia,
440 bionomia e relações tróficas em áreas restritas. *Acta Biologica Paranaense*. **1**: 67-108.
- 441 **Alves-dos-Santos I. 1999.** Distribuição vertical de uma comunidade de abelhas
442 (Hymenoptera, Apoidea) do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Entomologia* **43**:
443 225-228.
- 444 **Andrade-Lima D. 1981.** The caatingas dominium. *Revista Brasileira de Botânica* **4**:
445 149-163.
- 446 **APG III. 2009.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the
447 orders e families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*
448 **161**: 105-121.
- 449 **Baker HG. 1974.** The evolution of weeds. *Annual Review of Ecology e Systematics* **5**:
450 1-24.
- 451 **Barett SCH, Husband BC 1997.** Ecology e Geneics of Ephemeral Plant Populations:
452 *Eichornia paniculata* (Pontederiaceae) in Northeast Brazil. *Jounal of Heredity* **88**: 277-
453 284.
- 454 **Cane JH, Sipes S. 2006.** Characterizing Floral Specialization by Bees: Analytical
455 Methods e Revised Lexicon for Oligolecty. In: Waser NM, Ollerton J. eds. *Plan-*
456 *Pollination Interactions: From specialization to Generalization*. The University of
457 Chicago Press: Chicago, 99-121.
- 458 **Carvalho AT, Schlindwein C. 2011.** Obligate association of an oligolectic bee e a
459 seasonal aquatic herb in semi-arid north-eastern Brazil. *Biological Journal of the*
460 *Linnean Society* **102**: 355–368.
- 461 **CPTEC 2009.** Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos. Available
462 <http://www.cptec.inpe.br/>
- 463 **Ducke A. 1908.** Contribution á la connaissance de la faune hyménoptérologique do

- 464 Nord-Est du Brasil – II. Hyménoptères récoltés dans l’Etat de Ceará en 1908.
465 *Revue d’Entomologie (Caen)* **27**: 57-87.
- 466 **Ducke A. 1910.** Contribution á la connaissance de la faune hyménoptérologique do
467 Nord-Est du Brasil – III. Hyménoptères récoltés dans l’Etat de Ceará en 1909 et
468 supplement aux listes antérieures. *Revue d’Entomologie (Caen)* **28**: 78-122.
- 469 **Feinsinger P. 1983.** Coevolution e pollination. In: Futuyma, DJ. Slatkin M. eds.
470 *Coevolution*. Sinauer: Sunderland 282-320.
- 471 **Haynes RR, Holm-Nielsen L B. 1992.** The Limnocharitaceae. *Flora Neotropica*
472 *Monographs New York Botanical. Garden. New York* **56**: 1-32.
- 473 **Haynes RR, Holm-Nielsen L B. 1994.** The Alismataceae. *Flora Neotropica*
474 *Monographs New York Botanical. Garden. New York* **64**: 1-112.
- 475 **Johnson SD, Steiner KE. 2000.** Generalization versus specialization in plant
476 pollination systems. *Tree* **15**: 140-143.
- 477 **Kearns CA, Inouye, DW 1993.** *Techniques for pollination biologists* 1th edn.
478 University Press of Colorado.
- 479 **Lehtonen S. 2008.** An integrative approach to species delimitation in *Echinodorus*
480 (Alismataceae) e the description of two new species. *Kew Bulletin* **63**: 525–563.
- 481 **Linsley EG. 1958** The ecology of Solitary bees. *Hilgardia* **27**: 543-599.
- 482 **Maltchik L, Medeiros ESF. 2006.** Conservation importance of semi-arid streams in
483 north-eastern Brazil: implications of hydrological disturbance e species diversity
484 Aquatic Conservation: Marine e Freshwater Ecosystems. *Aquatic Conservation-Marine*
485 *e Freshwater Ecosystems* **16**: 665–677.
- 486 **Maltchik L, Pedro F. 2001.** Responses of aquatic macrophytes to disturbance by flash
487 floods in a Brazilian semiarid intermittent stream. *Biotropica* **33**: 566–572.
- 488 **Maltchik, L. 1999.** Ecologia de Rios Intermitentes tropicais. In: Pompêo MLM.
489 ed *Perspectivas da Limnologia no Brasil*, São Luís: Gráfica e Editora União .
- 490 **Matias LQ. 2007.** O genero *Echinodorus* (Alismataceae) do dominio da Caatinga
491 brasileira. *Rodriguesia* **58**: 743-774.
- 492 **Matias LQ, Soares A, Scatena V. 2008.** Anatomy of *Echinodorus* (Alismataceae)
493 scapes from Northeastern Brazil as applied to taxonomy. *Edinburgh Journal of Botany*
494 **65**: 1-11.
- 495 **Matias LQ. 2010.** A Sinopse of Alismataceae from the semi-arid of northeastern Brazil.
496 *Revista Caatinga* **23**: 46-53.
- 497 **Matias LQ, Souza DJL. 2011.** A família Alismataceae no Estado do Ceará, Brasil.
498 *Rodriguesia* **62**: 887-900.

- 499 **Matias LQ, Irgang BE. 2006.** Taxonomy e distribution of *Sagittaria* (Alismataceae) in
500 north-eastern Brazil. *Aquatic Botany* **84**: 183-190.
- 501 **Melo GAR. 1996.** Two new Brazilian bees of the genus *Protodiscelis* (Hymenoptera,
502 Apoidea). *Revista brasileira de Entomologia* **40**: 97-100.
- 503 **Michener C. 1974.** *The Social Behavior of the Bees- A Comparative study*. Cambrige:
504 Belknap.
- 505 **Michener C. 2007.** *The bees of the world*. Baltimore: The Johns Hopkins University
506 Press.
- 507 **Minckley RL, Roulston TH. 2006.** Incidental mutualisms e pollen specialization
508 among bees. In: Waser NM, Ollerton J. eds. *Plant–pollinator interaction: from*
509 *specialization to generalization*. Chicago, IL: University of Chicago Press, 69–98.
- 510 **Muenchow G, Delesalle VA. 1994.** Pollinator response to male floral display size in
511 two *Sagittaria* (Alismataceae) species. *American Journal of Botany* **81**: 568-573.
- 512 **Pansarin ER, Pansarin LM. 2011.** Reproductive biology of *Echinodorus*
513 *grandiflorus* (Alismataceae): evidence of self-sterility in populations of the state of São
514 Paulo. *Rodriguésia* **62**: 213-221.
- 515 **Pansarin ER. 2009.** Reproductive biology of *Echinodorus longipetalus* (Alismataceae):
516 Sexual morphs, breeding system e pollinators. *Aquatic Botany* **89**: 404-408.
- 517 **Prado D. 2003.** As caatingas da América do Sul. In: Leal I.R., Tabarelli M. Silva J.M.C.
518 eds. *Ecologia e conservação da Caatinga* 3-73. Editora Universitária: Universidade
519 Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
- 520 **Praz CJ, Müller A, Dorn S. 2008.** Specialized bees fail to develop on non-host pollen:
521 do plants chemically protect their pollen. *Ecology* **89**:795–804.
- 522 **Ramalho M. 2004.** The stingless bees e the mass-flowering trees in the canopy of
523 Atlantic rainforest: a tight relationship?. *Acta Botanica Brasilica* **18**: 37-47.
- 524 **Robertson C. 1925.** Heterotropic bees. *Ecology* **6**:412-436.
- 525 **Sampaio EVSB. 1995.** Overview of the Brazilian caatinga. In: Bullock SH, Mooney
526 HA, Medina E, eds. *Seasonally Tropical Dry Forests*. Cambridge: Cambridge
527 University Press, 35-63.
- 528 **Schlindwein C. 1998.** Frequent oligolecty characterizing a diverse bee-plant
529 community in a xerophytic bushland of subtropical Brazil. *Studies on Neotropical*
530 *Fauna e Environment* **33**: 46-59.
- 531 **Schlindwein C. 2004.** Are oligolectic bees always the most effective pollinators? In:
532 Freitas BM, Pereira JOP. eds. *Solitary bees. Conservation, rearing e management for*
533 *pollination*. Fortaleza: Imprensa Universitária 231-240.

- 534 **Schiestl, FP, Huber FK, Gomez JM. 2011.** Phenotypic selection on floral scent: trade-
535 off between attraction and deterrence? *Evolutionary Ecology* **25**: 237–248.
- 536 **Silveira, FA, Melo, GAR, Almeida, EAB. 2002.** *Abelhas brasileiras. Sistemática e*
537 *identificação*. Belo Horizonte.
- 538 **Vieira FV, Lima NAS. 1997.** Pollination of *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae).
539 *Aquatic botany* **58**:89-98.
- 540 **Waser, N. M. e Ollerton, J. eds 2006. Plant pollinator interactions: from**
541 **specialization to generalization**. University Chicago Press.
- 542 **Wilms W. 1995.** *Die Bienenfauna im Kustenregenwald Brasiliens und ihre Beziehungen*
543 *zu Blütenpflanzen: Fallstudie Boracéia*. PhD Thesis, University of São Paulo, São
544 Paulo, Brazil.
- 545 **Zanella FCV. 2000.** The bees of Caatinga (Hymenoptera, Apoidea, Apiformes): a
546 species list e comparative notes regarding their distribution. *Apidologie* **31**: 579-592.

1 *Tabelas*

2

3 Tabela 1: Sistema reprodutivo e sucesso reprodutivo de *Echinodorus palaefolius* após diferentes tratamentos de polinização controlada
 4 em Pedra, Brasil (média $\pm$ desvio padrão). Autopolinização manual - as flores foram polinizadas com o próprio pólen; Autopolinização
 5 espontânea - os botões foram marcados e ensacados ou inflorescências somente com botões foram totalmente ensacadas e após 30 dias
 6 os pedicelos das flores foram contados; Autopolinização geitonogâmica - flores foram polinizadas com pólen de flores da mesma
 7 inflorescência; Polinização cruzada manual - flores foram polinizadas com pólen de plantas distantes no mínimo 15 metros; Controle em
 8 campo - flores foram marcadas e ficaram acessíveis aos visitantes florais; Controle na ausência de *Protodiscelis alismatis* - flores foram
 9 marcadas no jardim experimental e ficaram acessíveis aos visitantes florais. Aquênios formados foram contabilizados para cada
 10 experimento.

Tratamento	N	Flores com frutos formados	Sucesso %	Aquênios formados (média $\pm$ DP)
Autopolinização manual	83	5	6,0	4,4 $\pm$ 2,6
Autopolinização espontânea (inflorescências ensacadas)	1291	1	0,08	37
Autopolinização espontânea (flores marcadas individualmente)	101	0	0	0
Autopolinização geitonogâmica	27	0	0	0
Polinização cruzada manual	74	73	99	115 $\pm$ 21
Controle (flores acessíveis aos visitantes florais)	203	165	81,2	105 $\pm$ 22
Controle na ausência de <i>Protodiscelis alismatis</i>	88	51	58	85 $\pm$ 6

- 1 Tabela 2: Visitantes florais de espécies de *Echinodorus* em 41 alagados em seis estados
2 do Nordeste do Brasil. Na coluna “Espécie mais frequente”: P = *Protodiscelis alismatis*;
3 A = *Apis mellifera*; T = *Trigona spinipes*; O = outras abelhas (*Plebeia* cf. *flavocincta*,
4 *Dialictus* sp.).

Alagados	Planta	<i>Protodiscelis alismatis</i>	<i>Trigona spinipes</i>	<i>Apis mellifera</i>	Outras abelhas	Espécie mais frequente
Ceará						
Caucaia	<i>E. subalatus</i>	X	X	X		P
Crato 1	<i>E. palaefolius</i>	X		X		P
Crato 2	<i>E. palaefolius</i>			X		A
Paraíba						
Campina Grande	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X		P
Pernambuco						
Alagoinha	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X		P
Araripina	<i>E. palaefolius</i>	X	X			T
Arcoverde	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X		P
Belo Jardim 1	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X		P
Belo Jardim 2	<i>E. subalatus</i>	X	X	X		A
Bom Conselho	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X		P
Buíque	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X		P
Cabrobó	<i>E. palaefolius</i>	X				P
Caruaru	<i>E. palaefolius</i>	X	X			T
Custódia	<i>E. palaefolius</i>	X		X		P
Pedra 1	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X	X	P
Pedra 2	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X		P
Pedra 2	<i>E. subalatus</i>	X	X	X		P
Pedra 3	<i>E. palaefolius</i>	X	X			P
Pedra 4	<i>E. subalatus</i>	X	X	X	X	P
Gravatá	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X		A
Sanharó	<i>E. subalatus</i>	X	X	X		P
Santa Filomena	<i>E. palaefolius</i>	X	X			P
Serra Talhada 1	<i>E. subalatus</i>	X	X	X		A
Serra Talhada 2	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X		P
Tacaimbó	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X		A
Venturosa 1	<i>E. subalatus</i>	X				P
Venturosa 2	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X	X	P
Venturosa 3	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X		P
Piauí						
Caracol	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X		P
Jacobina do Piauí 1	<i>E. subalatus</i>	X	X			P
Jacobina do Piauí 1	<i>E. cf. pubescens</i>	X	X			P
Jacobina do Piauí 2	<i>E. cf. paniculatus</i>	X	X	X		P
Paulistana 1	<i>E. subalatus</i>			X		A
Paulistana 2	<i>E. subalatus</i>	X				P
Picos	<i>Echinodorus</i> sp.	X		X		A
Rio Grande do Norte						
S. Negra do Norte 1	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X		P
S. Negra do Norte 2	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X		P
S. Negra do Norte 3	<i>E. subalatus</i>	X	X	X		P
S. Negra do Norte 4	<i>E. subalatus</i>	X	X	X		P
S. Negra do Norte 5	<i>E. subalatus</i>	X	X	X		P
Sergipe						
Canindé do São Francisco	<i>E. palaefolius</i>	X	X	X		P

1 Figuras

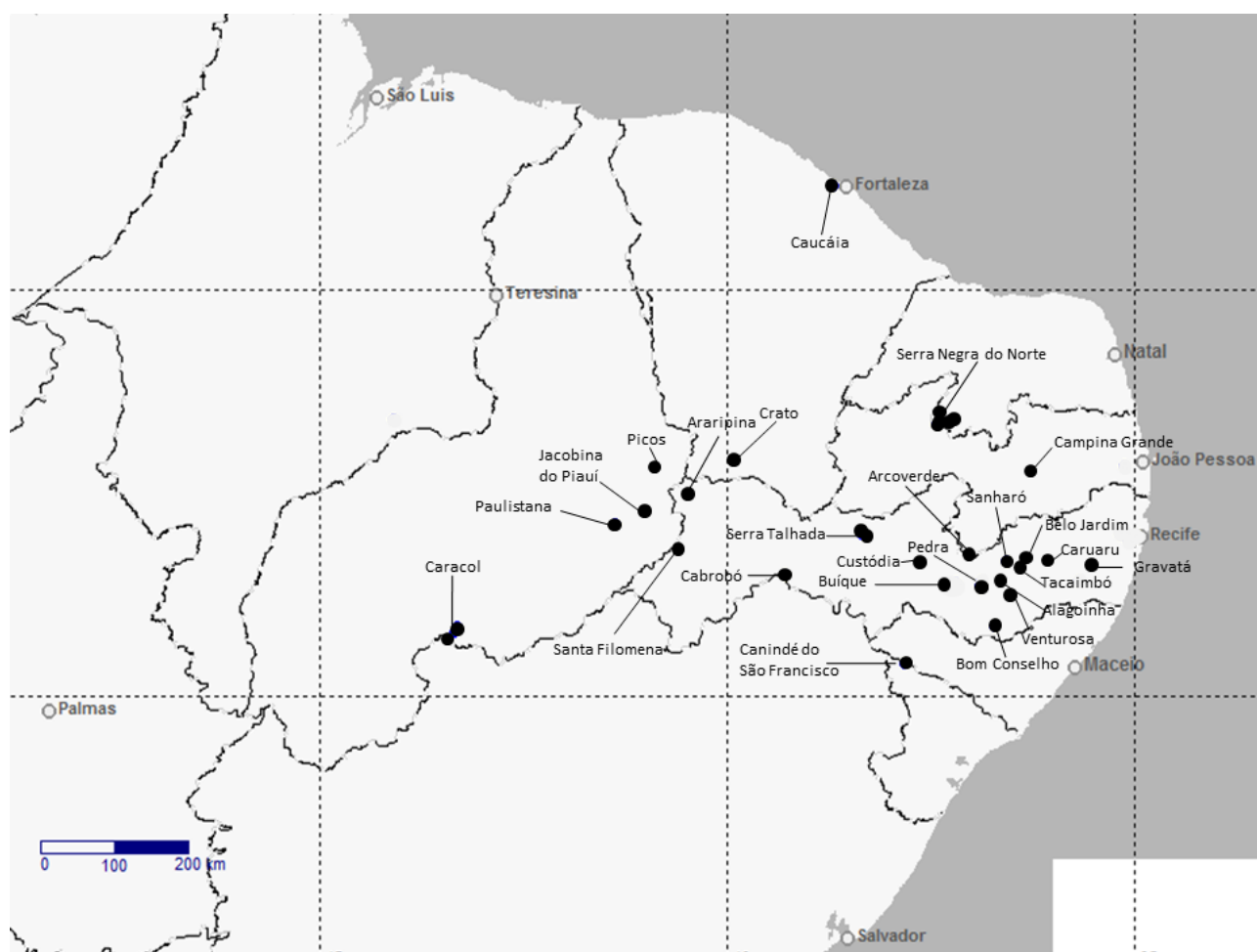


Fig. 1: Pontos de coleta de abelhas em flores de *Echinodorus* (Alismataceae) no nordeste do Brasil. Mapa base de referência do software TrackMaker.

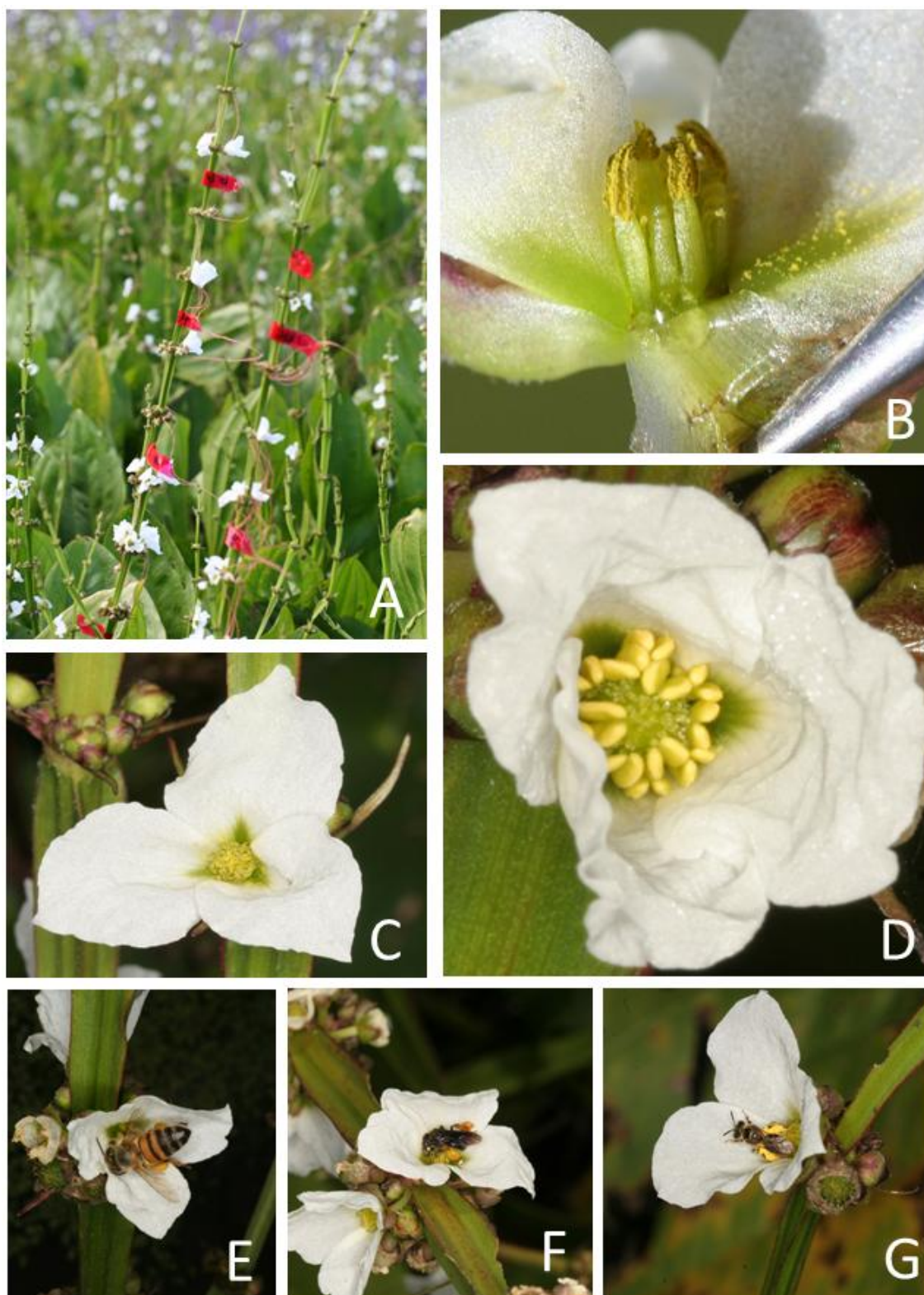


Fig. 2: *Echinodorus palaefolius*, população do município de Pedra, “Fazenda Gentio”, Pernambuco, Brasil. A- Inflorescências marcadas; B- gotícula de néctar acumulado na base das pétalas; C- flor logo após a abertura; D- flor abrindo com anteras ainda fechadas; E- G- Visitantes florais frequentes, E- Operária de *Apis mellifera*; F- Operária de *Trigona spinipes*; G- Fêmea de *Protodiscelis alismatis*.

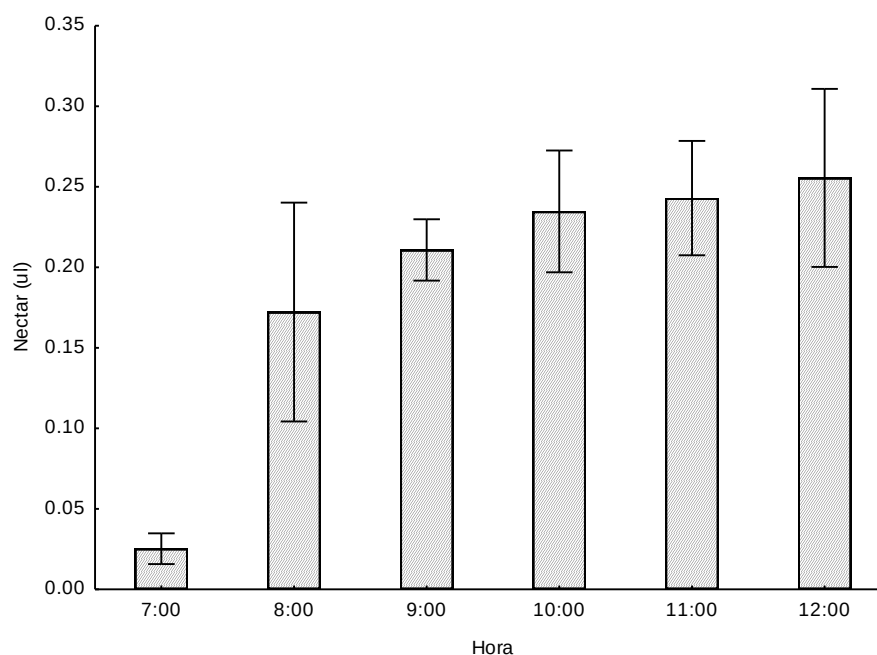


Fig. 3: Volume de néctar acumulado em flores ensacadas de *Echinodorus palaefolius* ao longo da antese, mostrado em intervalos de 1 h (n = 10 flores por horário) em Pedra, Pernambuco. Barras de erro denotam desvio padrão.

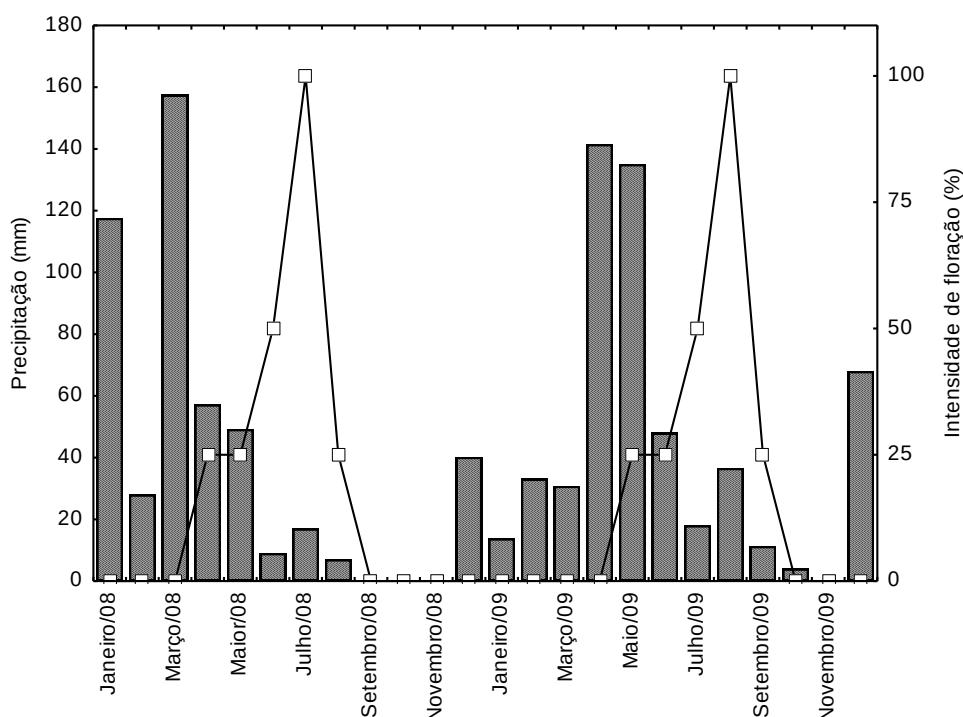


Fig. 4: Precipitação média mensal no município de Pedra, Pernambuco, em 2008 – 2009 (barras, eixo esquerda) e fenologia da floração de *Echinodorus palaefolius* (linhas, eixo da esquerda). A intensidade de floração foi determinada em uma escala visual de 0-100% através da análise de fotografias dos alagados.

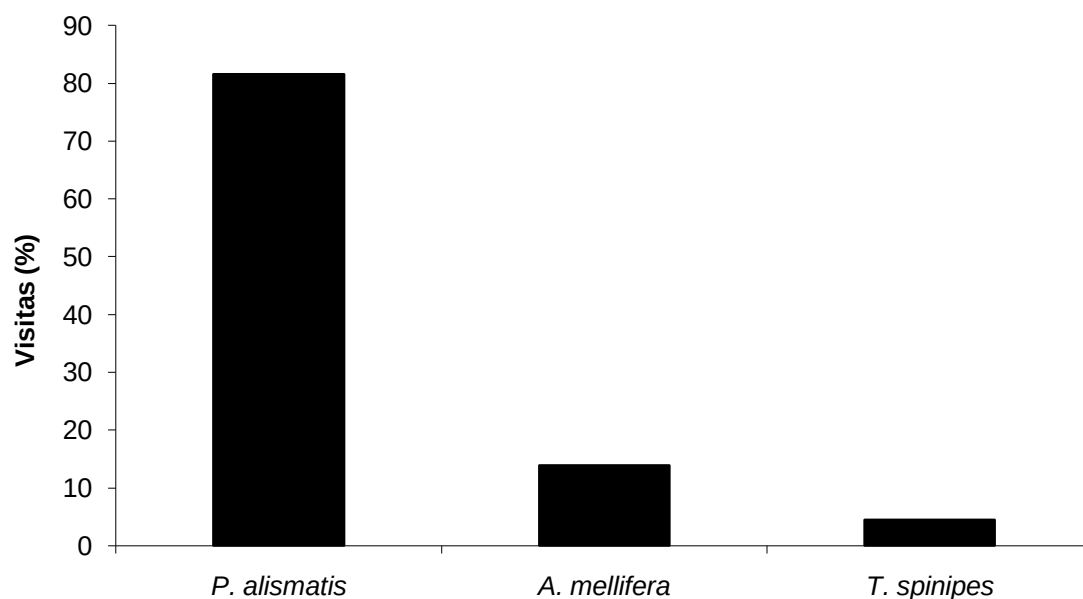


Fig. 5: Frequência relativa de visitas por espécies em flores de *Echinodorus palaefolius* em Pedra e Venturosa, Pernambuco, Brasil (n= 60 flores, n=2 alagados).

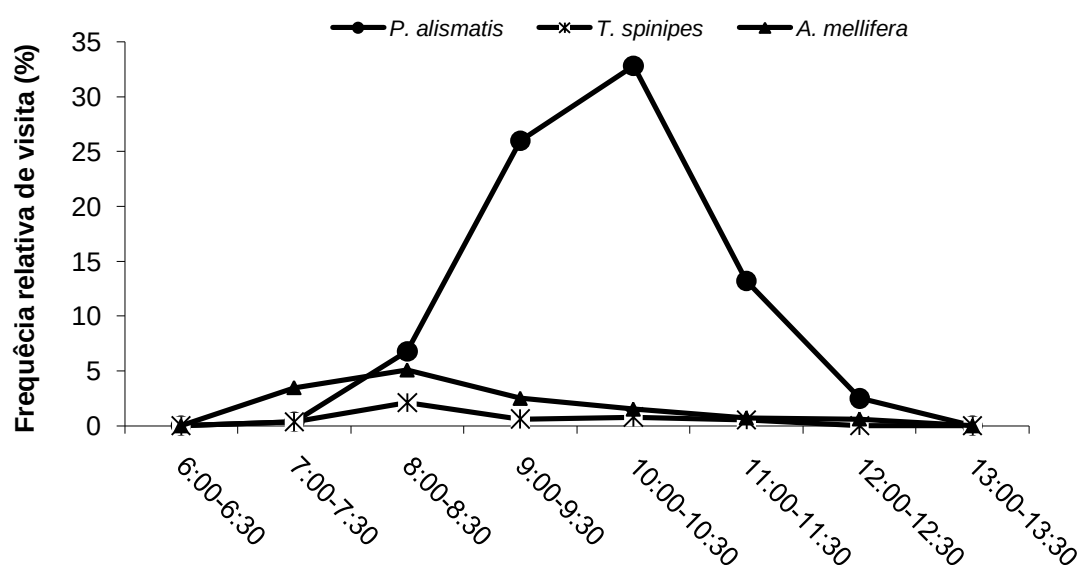


Fig. 6: Frequência relativa de visitas de abelhas de *Protodiscelis alismatis*, *Apis mellifera* e *Trigona spinipes* a flores *Echinodorus palaefolius* durante a antese (n = 60 flores), a partir de observações em duas populações localizada no município de Pedra e Venturosa, Pernambuco, Brasil.

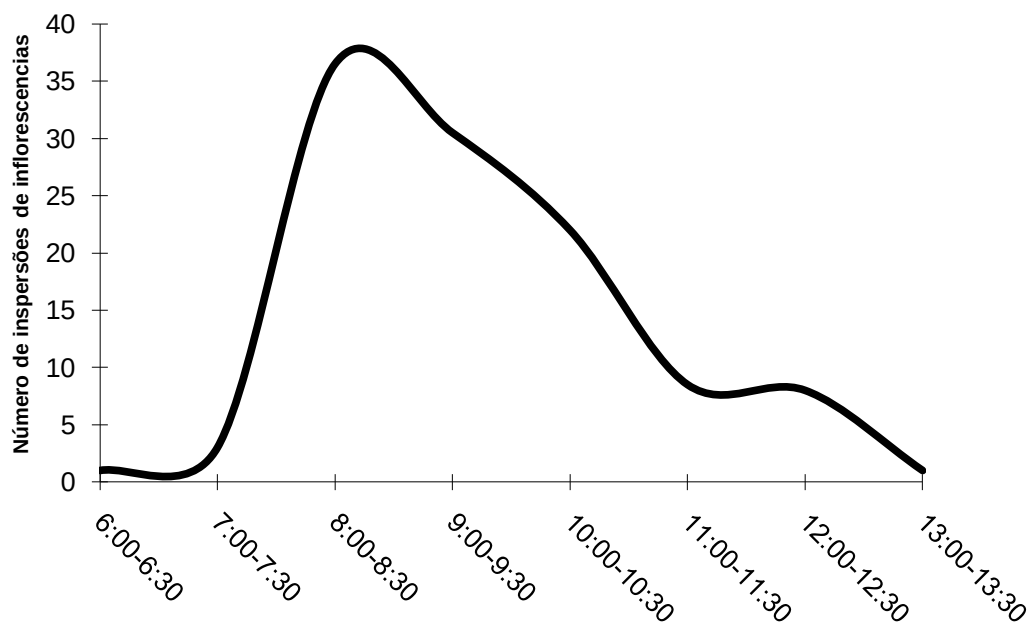


Fig. 7: Inspeções de flores por machos de *Protodiscelis alismatis* em seis inflorescências de *Echinodorus palaefolius*. Observações oriundas da população de Pedra, Pernambuco, Brasil.

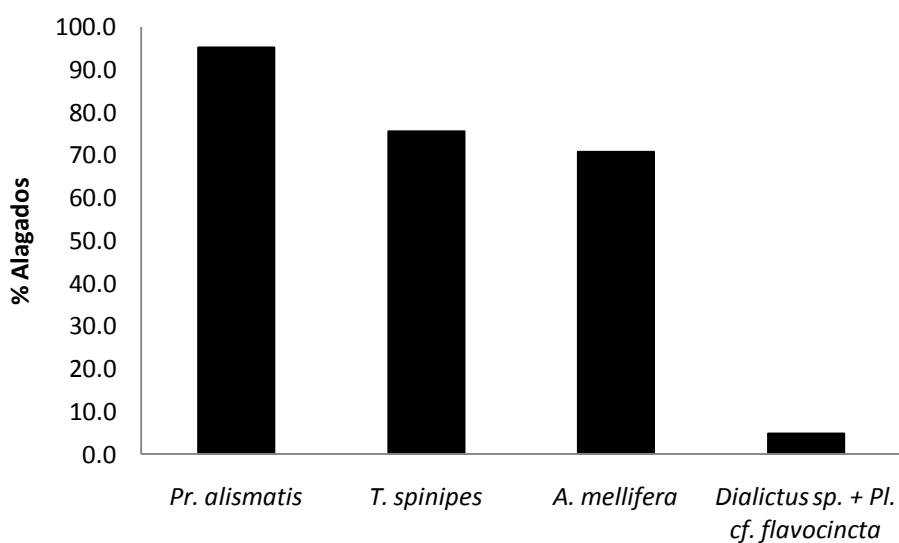
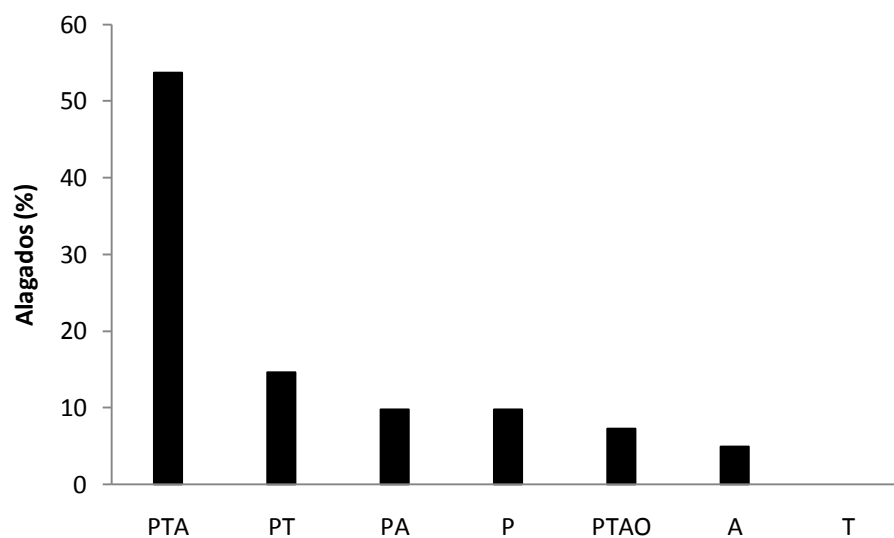


Fig. 8: Frequência relativa de ocorrência das espécies de abelhas visitantes florais de *Echinodorus* em 41 alagados temporários na Caatinga, Nordeste do Brasil. Pr = *Protodiscelis*, T = *Trigona*, A = *Apis*, Pl = *Plebeia*.



39

40 Fig. 9: Percentual de alagados amostrados com as espécies de abelhas em flores de
 41 *Echinodorus* (Alismataceae) na Caatinga. P=*Protodiscelis alismatis*, T=*Trigona*
 42 *spinipes*, A=*Apis mellifera* O= outras espécies (*Dialictus* sp. e *Plebeia* cf. *flavocincta*).

5.2 Manuscrito

A ser submetido à revista *Aquatic Botany*

Artigo Original

Titulo:

Polinização em *Limnocharis* e *Hydrocleys* (Alismataceae): reprodução de três espécies potencialmente invasoras

Airton Torres Carvalho^{a*} e Clemens Schlindwein^b

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, 58059-900 João Pessoa, PB, Brazil

^b Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

Autor para correspondência: Airton Torres Carvalho; e-mail: carvalhoairton@yahoo.com.br

RESUMO

O sistema reprodutivo e a interação com polinizadores são variáveis importantes na predição de avanços de distribuição de plantas invasoras. Estudamos a ecologia da polinização de *Limnocharis flava*, *L. laforestii* e *Hydrocleys nymphoides*, espécies aquáticas do clado *Limnocharis-Hydrocleys* de Alismataceae (Alismatales) em populações nativas no nordeste e centro oeste do Brasil. Relacionamos os atributos florais, morfologia floral e espectro de visitantes com o potencial invasor das espécies. As duas espécies de *Limnocharis* foram autocompatíveis e formaram grande número de sementes mesmo sem presença de visitantes florais. Flores de *L. flava* são morfologicamente especializadas, apresentam uma câmara de pólen formada por estaminódios e são polinizadas unicamente por abelhas oligoléticas de *Protodiscelis palpalis* (Colletidae, Neopasiphaeinae). As flores de *L. laforestii* possuem estaminódios, mas não formam uma câmara de pólen. Além de *P. palpalis* e *Protodiscelis* sp., várias outras espécies de abelhas de pequeno porte visitaram e polinizaram suas flores. *Hydrocleys nymphoides* é autoincompatível, mas a morfologia simples das flores promove um sistema generalista de polinização onde abelhas sociais de médio a grande porte são polinizadores efetivos. O sistema reprodutivo e o sistema generalista de polinização garantem grande produção de sementes para as espécies estudadas. A grande capacidade de formação de sementes até na ausência de polinizadores das duas espécies de *Limnocharis* torna essas espécies plantas invasoras potenciais em regiões tropicais e subtropicais. As plantas de *H. nymphoides* possuem capacidade menor para ocupação de corpos de água novos, porque demandam visitantes florais para formação de frutos e sementes. Entretanto o sistema generalista garante grande produção de frutos.

Palavras-chave

Limnocharis flava;
Limnocharis laforestii;
Hydrocleys nymphoides;
Plantas invasoras;
Invasões biológicas;
Macrófitas;
Abelhas oligoléticas;

Destaques:

- Comparação da polinização de três espécies nativas de *Limnocharis* e *Hydrocleys* potencialmente invasoras é descrita no Brasil.
- Atributos florais e ecologia da polinização foram relacionadas a capacidade invasora dessas plantas aquáticas.
- O conjunto de atributos florais, sistema reprodutivos e visitantes florais explica o potencial invasor.
- Ausência do polinizador oligolético não diminuiu a capacidade reprodutiva em *Limnocharis*.
- Polinizadores generalistas garantem alta produção de frutos em *H. nymphoides* o que explica sua capacidade como planta invasora.

1. Introdução

A distribuição geográfica de uma espécie vegetal depende, entre outros fatores, de sua região de origem, processos de dispersão e de adaptação (Gaston, 1996). A distribuição natural de espécies, entretanto, tem sido alterada por introduções intencionais ou acidentais de indivíduos em ambientes exóticos, o que pode acarretar invasões biológicas com riscos ambientais e econômicos (Elton, 1958; Richardson e Pysek, 2008; Barrett 2011). Para espécies vegetais têm sido demonstrada alta incidência de espécies invasoras entre as macrófitas de água doce (Daehler, 1998). A alta plasticidade fenotípica e capacidade de reprodução destacam-se entre os fatores adaptativos importantes em invasões biológicas entre essas plantas (Barrett et al., 1993, Barrett 2011). Frequentemente, essas espécies apresentam alta capacidade de reprodução clonal (Barrett et al., 1993), entretanto, ao contrário do esperado, tem sido encontrada alta diversidade genética em populações invasoras (revisão em Bossdorf et al., 2005). Normalmente, as pressões durante a invasão biológica expõem as populações à rápida evolução na adaptação local (Prentis et al., 2008), e uma das chaves para essa rápida evolução é a reprodução sexuada, seja ela autógama ou não (Barrett 2011).

Espécies com ampla distribuição são mais susceptíveis a ser tornar invasoras, e essa habilidade normalmente está relacionada à capacidade de reprodução autógama (Baker, 1955, 1965, 1974; Pannel e Barrett, 1998; Beest et al., 2012). Alguns estudos, entretanto, têm mostrado que espécies poliploides apresentam distribuições geográficas mais amplas que diploides irmãs, o que evidencia que a diversidade genética e a habilidade de colonização pode desempenhar um papel significativo na extensão da distribuição geográfica de uma espécie vegetal, bem como sua capacidade de invasão (Lowry e Lester, 2008; Beest et al., 2012). Populações poliploides teriam um genoma mais versátil o que predispõem melhores adaptações a um ambiente novo. Os modelos propostos, entretanto, são complementares (Beest et al., 2012). Espécies invasoras devem apresentar uma combinação de variáveis pré-adaptadas que as tornam invasoras potenciais, tais como: predisposição genética a um nicho amplo, alta taxa de reprodução e sobrevivência (Beest et al., 2012).

O clado das limnocharitaceas da família Alismataceae (*sensu* APG III, 2009) (Chen et al., 2012) abrange um grupo pequeno de macrófitas aquáticas (7ssp) (Haynes e Holm-Nielsen, 1992), adequadas para testar hipóteses a cerca do seu potencial como plantas invasoras. Alguns representantes são invasores e pelo menos um apresenta

relações especializadas com abelhas oligoléticas. Reconhecido com um dos gargalos para o estabelecimento inicial de uma espécie potencialmente invasora (Baker, 1965; Beest et al., 2012), sua alta capacidade reprodutiva pode ser afetada pela ausência do polinizador especializado.

A oligoletia é uma adaptação geneticamente determinada (Praz et al., 2008) em algumas espécies de abelhas, nas quais as fêmeas coletam pólen somente em espécies do mesmo gênero ou família de plantas (Robertson, 1925; Cane e Sipes, 2006). Frequentemente, as abelhas oligoléticas são os polinizadores mais eficientes nessas interações (eg. Cane et al., 1985; Schlindwein e Wittmann, 1995; 1997a, b; Schlindwein et al., 2005; Milet-Pinheiro e Schlindwein, 2010) e sua ausência pode reduzir drasticamente a capacidade reprodutiva das espécies. Na planta aquática *Hydrocleys martii* Seub. (Alismataceae), que é comum em alagados temporários na região da Caatinga do semiárido nordestino, a produção de frutos foi quase nula na ausência do polinizador oligolético, *Protodiscelis palpalis* (Colletidae, Neopasiphaeinae). As flores apresentam estaminódios que se cerram e formam uma câmara de pólen central (filtro floral) e somente abelhas de *P. palpalis* adentram os estaminódios para coletar pólen e polinizaram as flores (Carvalho e Schlindwein, 2011).

De outras espécies do clado limnocharitaceas não há informações quanto à biologia reprodutiva em ambiente nativo. Duas das espécies são invasoras ou potencialmente invasoras: *Limnocharis flava* (L.) Buchenau que ocorre naturalmente na América do Sul e Central (Haynes e Holms Nielsen, 1992), tem sido reportada como invasora no Sudeste asiático, China, Índia, no continente australiano e nos Estados Unidos da América (Song et al., 2000a; Waterhouse 2003; Abhilash et al., 2008; USDA NRCS, 2012). *Hydrocleys nymphoides* (Wild) Buchenau, também natural da América do Sul e Central, tem sido tratada, recentemente, como invasora nos Estados Unidos da América, sendo encontrada em diversas regiões do país (MacRoberts e MacRoberts, 2010; NatureServe, 2012). Observações em *L. flava* na China mostraram que essa espécie foi autocompatível e formou grande número de sementes (Song et al., 2000a). Além disso, apresenta diversidade genética alta para uma espécie autogâmica (Song et al., 2000b).

Estudamos, nas três espécies do clado mais comumente encontradas no Brasil, a biologia reprodutiva e correlacionamos os atributos e visitantes florais ao potencial como invasor dessas espécies. Determinamos o sistema reprodutivo em populações

nativas das três espécies, os visitantes florais e polinizadores efetivos e descrevemos a biologia floral. Discutimos o papel do sistema reprodutivo, morfologia funcional das flores e interações com polinizadores em relação a sua capacidade de invasão de novas áreas.

2. Materiais e Métodos

O clado limncharitaceas (Alismataceae) é composto de sete espécies descritas de macrófitas aquáticas que vegetam em áreas alagadas e margens de rios de baixo fluxo de água. O gênero *Hydrocleys* (5 spp) apresenta espécies com raízes fixas ao substrato e folhas e inflorescências flutuantes, enquanto *Limnocharis* (2 spp) são emergentes (Haynes e Holm-Nielsen, 1992).

2.1. Espécies e populações estudadas

Hydrocleys nymphoides é uma erva aquática perene com flores grandes e estaminódios curtos, o que proporciona livre acesso ao néctar e pólen aos visitantes florais. Ocorre desde o Uruguai e Mato Grosso até o Pará, e América Central. Populações estudadas foram oriundas de (1) Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, coletadas em açude com alta concentração de matéria orgânica e derramamento de esgoto doméstico (08°05' 46"S 35°03' 20"O), (2) São Lourenço da Mata, Pernambuco, coletadas em canal de drenagem de baixo fluxo de uma plantação de cana de açúcar (08°03' 17"S 35°03'04"O), (3) Recife, Pernambuco, açude de águas límpidas no Parque estadual de Dois Irmãos (08°04'13"S 34°57' 12"O), (4) Cruz do Espírito Santo, Paraíba, coletadas em um canal de escoamento do açude de uma Usina de cana de açúcar (07°10'49"S 35°05'39"O).

Limnocharis flava é uma erva aquática emergente perene com folhas verde-pálidas, ovaladas e pecíolo triangular. A inflorescência é umbeliforme com várias flores de tamanho intermediário com pétalas amarelo-pálidas e estaminódios numerosos que protegem o recurso de pólen, semelhante às de *H. martii*. Apresenta ampla distribuição geográfica nos neotrópicos desde o México ao sul da América do Sul. Foi introduzida na América do Norte, Ásia e Oceania (Haynes e Holm-Nielsen 1992). As populações estudadas foram coletadas em: (1) Recife, Pernambuco, Bairro Morada Nova, área alagado do Rio Capibaribe com alta concentração de matéria orgânica e esgoto doméstico (08°01'33"S 34°57'21"), (2) Recife, Pernambuco, Bairro do Curado, alagado as margens da BR 232 com derramamento de esgoto doméstico (08°05'58"S

34°58'53"O), (3) São Lourenço da Mata, Pernambuco, bairro de Matriz da Luz em canal de drenagem de uma plantação de cana de açúcar (08°04'30"S 35°04'23"O), (4) Camaragibe, Pernambuco, Bairro do Vale das Pedreiras em alagado com alta concentração de esgoto doméstico (08°01'29"S 34°57'58"O), (5) Bayeux, Paraíba, margem da BR 230 em canal de drenagem da rodovia com derramamento de esgoto doméstico (07°06'59"S 34°55'16"O).

Limnocharis laforestii é uma erva aquática perene emergente com folhas verde-pálidas, flores menores que as de *L. flava* com pétalas de coloração amarelo-pálido e poucos estaminódios. Ocorre do México a Bolívia e Argentina (Haynes e Holm-Nielsen, 1992). Espécimes foram coletados nos municípios de (1) Santa Rita do Araguaia, Goiás, em um alagado raso na Bacia do Rio Babilônia (09°00'06"S 50°23'38"O), (2) Goiana, Pernambuco, alagado as margens do Rio Tracunhaém (07° 33'29"S 34°59'09"), (3) Serra Negra do Norte, Rio Grande do Norte, num alagado temporário as margens da BR427 (06°39'55"S 37°23'36"O). Indivíduos das localidades estudadas apresentaram diferenças na morfologia floral e também vegetativas. Enquanto as plantas provenientes de Santa Rita do Araguaia, Goiás tiveram folhas alongadas quase lanceoladas (Fig. 2F), as plantas de Goiana, Pernambuco e de Serra Negra do Norte, Rio Grande do Norte, tiveram folhas elípticas. As flores da população de Goiás tiveram diâmetro floral menor e número de estaminódios reduzido quando comparadas a população de Goiana (veja resultados). A espécie tem grande semelhança com *L. flava*, entretanto diferencia-se por apresentar inflorescências menores que o comprimento do pecíolo das folhas, que normalmente é arredondado em corte transversal, diferente de *L. flava* que tem inflorescências maiores que o pecíolo das folhas que é triangular em corte transversal (Haynes e Holm-Nielsen, 1992; Matias e Souza, 2011). Os grãos de pólen de *L. flava* são quase esferoidais, os de *L. laforestii* são triangulares em vista polar (Carvalho e Schlindwein não publicado).

2.2. Biologia e morfologia floral

Para as populações estudadas (exceto *L. laforestii* proveniente de Serra Negra do Norte) entre 7 e 40 indivíduos foram mantidos em um Jardim Experimental localizado no Meliponário do Senhor Rodrigo Otávio Carvalho, município de Camaragibe, Pernambuco. Aquários de 50 ℓ preenchidos com 20 ℓ de uma mistura de 50% de areia lavada e 50% de terra vegetal foram usados para aclimatar as plantas. Entre um e dez indivíduos foram plantados por aquário. Análises morfométricas, descrição da antese,

número de flores e inflorescências e experimentos para determinação do sistema reprodutivo foram realizados nos espécimes cultivados. Observações e experimentos foram realizados de junho de 2008 a junho de 2011.

Uma flor fresca por indivíduo foi dissecada e medida com auxílio de paquímetro digital (tabela 1). Foi determinado o número de estaminódios e de estames férteis. Adicionalmente foi medido o tamanho das anteras dos ciclos internos em 10 flores de *H. nymphoides* da população de Cruz do Espírito Santo (tabela 2). Os frutos foram analisados quanto à deiscência, número de carpelos e tamanho. O número de flores por inflorescência, inflorescências por planta e duração do amadurecimento dos frutos foram verificados e contabilizados em indivíduos de todas as populações. Para a população de *L. laforestii* em Serra Negra do Norte não foram tomadas as medidas morfométricas. O número de partes florais foi contado a partir de botões fixados em álcool 70%.

O decorrer da antese floral foi acompanhado em 10-30 botões florais ensacados em plantas cultivadas (tabela 1). Nessas flores foi determinada a longevidade floral e o horário da disponibilidade de néctar e pólen. A receptividade estigmática foi verificada com peróxido de hidrogênio e permanganato de potássio (Kearns e Inouye, 1993). O número de grãos de pólen por flor foi determinado em dois ou três botões por localidade com auxílio de câmara de Neubauer. As anteras foram maceradas dentro de tubos de ensaio e adicionado 1 ml de ácido láctico glicerinado 3:1. Após homogeneização em agitador vortex, alíquotas foram contadas na câmara. Um carpelo por flor foi dissecado e contado o número de óvulos em esteromicroscópio. O número de óvulos por flor foi determinado pela multiplicação do número de óvulos por capelo, pelo número de carpelos. A partir das contagens realizadas foi determinada a razão pólen/óvulo.

O sistema reprodutivo foi determinado através de experimento de polinização controlada em plantas cultivadas, em flores previamente ensacadas em tecido de organza na fase de botão. Foram realizados os seguintes experimentos: autopolinização espontânea, autopolinização manual e polinização cruzada manual. Adicionalmente, flores de *L. flava* foram emasculadas. O número de frutos foi contabilizado para todas as espécies em diferentes populações. O número de sementes por fruto foi contabilizado somente para *L. flava* e *L. laforestii*. A frutificação natural foi mensurada nas populações em condições naturais e no jardim experimental através da marcação individual de botões (tabela 3). Análise da variância foi utilizada para comparar a média

de sementes por fruto em cada tratamento em *L. flava* e *L. laforestii* da população de Goiana. Para *L. laforestii* da população de Alto Araguaia análise de Kruskal-Wallis foi feito, uma vez, que não houve homogeneidade das variâncias.

O espectro de visitantes florais foi determinado em coletas com rede entomológica em flores em todas as localidades amostradas (tabela 5). A frequência dos visitantes foi determinada pelo número de animais coletados em 30 minutos de coleta em cada local durante 3 a 4 dias ensolarados. As amostragens foram realizadas entre 10:00 e 12:00h. Escalonamos as espécies amostradas em: espécie visitante abundante, quando foram 10 ou mais indivíduos coletados; comum, entre 9 e 3 e raro quando entre um e dois indivíduos foram amostradas durante 30 min. O comportamento dos visitantes florais foi descrito a partir de observação *in situ*.

Vouchers foram depositados no Herbário da UFMG e duplicatas no Herbário da UFPB. Visitantes florais foram depositadas na Coleção Entomológica da Universidade Federal de Minas Gerais e Universidade Federal da Paraíba, Brasil.

3. Resultados

3.1. *Hydrocleys nymphoides*

As flores de *H. nymphoides* são grandes de coloração bege esverdeado e centro amarelo escuro ou roxo, com abertura da corola entre 35 a 50 mm e altura entre 30 e 37 mm (tabela 1; fig. 1). O androceu é formado por estaminódios de coloração amarela, avermelhada até roxa e estames férteis com filetes avermelhados ou roxos. O androceu apresenta entre 30 e 38 estaminódios e entre 24 e 38 estames férteis inseridos no receptáculo floral em uma espiral longa de seis a oito ciclos. Nos ciclos mais externos encontram-se os estaminódios, que são mais curtos que os estames férteis não recobrimo os estigmas. Em direção ao centro da flor surgem estaminódios com vestígios de anteras (fig. 1c). A partir do quarto ciclo encontram-se os estames férteis. O comprimento das anteras aumenta em direção ao centro da flor (tabela 2). As anteras abrem por uma fenda longa latrosa. O gineceu é formado por 6 a 9 carpelos livres, com tamanho entre 10,5 e 11,9 mm (n=10). Os estigmas com dois lóbus papilosos são localizados no ápice dos ovários ficando expostos acima da altura das anteras. Eles já foram receptivos na abertura das flores. As flores abriram sincronicamente entre 6:30 e 7:00 e fecharam entre 12:00 e 13:00. Cada flor produz em média 1383 ± 183 óvulos e

297343±41059 grãos de pólen, o que resulta em uma razão de 224±46 grãos de pólen por óvulo (tabela 1).

Cada inflorescência contou com quatro ou cinco flores que surgiram do ápice de um estolão. Após a abertura das flores folhas surgiram formando um módulo. Cada inflorescência disponibilizou uma flor a cada três ou quatro dias. Indivíduos apresentaram até 50 módulos. Os botões florais desenvolvem-se abaixo da linha da água. Crescem verticalmente emergindo da água somente no dia anterior a sua abertura. Após a antese as sépalas se fecham e as flores submergem. Os frutos maturam dentro da água.

As plantas das populações estudadas de *H. nymphoides* não formaram frutos espontaneamente (n=30) nem por autopolinização manual (n=22) (tabela 3). Na população de Jaboaão dos Guararapes, a polinização cruzada manual resultou em 70% de frutificação, enquanto àquela de Cruz do Espírito Santo em 100% das flores polinizadas. A taxa de frutificação natural foi em torno de 60% nos dois locais. Já no jardim experimental, 66% das flores das plantas da população Cruz do Espírito Santo resultaram em frutos, enquanto as de Jaboaão dos Guararapes 47% (tabela 3). Os frutos amadureceram entre 19 e 28 dias, quando então se abriram longitudinalmente liberando as sementes.

Foram observados visitantes florais de nove espécies em *H. nymphoides*, oito de abelhas e uma de borboleta. O espectro de visitantes florais variou entre as localidades observadas, mas operárias de *Apis mellifera* e *Trigona spinipes* foram os visitantes mais abundante em todas as quatro localidades (tabela 5). Operárias de *Bombus brevivillus* foram abundantes em Jaboaão dos Guararapes e em São Lourenço da Mata, enquanto foram raras em Cruz do Espírito Santo e ausentes em Dois Irmãos. Abelhas pequenas de *Plebeia cf flavocincta* e *Dialictus sp1.* foram comuns em locais diferentes. Uma e três fêmeas de *Protodiscelis palpalis* foram coletadas respectivamente em Cruz do Espírito Santo e em Jaboaão dos Guararapes. Um indivíduo de borboleta do gênero *Urbanus* (Hesperiidae) foi avistado visitando flores em Jaboaão dos Guararapes. No jardim experimental em Camaragibe foram amostrados indivíduos de *A. mellifera*, *T. spinipes*, *Plebeia cf. flavocincta*, *Scaptotrigona sp.* e *Pereirapis sp.*, todos visitaram as flores para coletar pólen e néctar, entretanto somente abelhas de porte médio de *A. mellifera* e grandes de *Bombus brevivillus* tocaram os estigmas frequentemente. Operárias de *T. spinipes* passaram vários minutos em uma flor o que resultou em deposição de pólen da

mesma flor nos estigmas. Operárias dessas abelhas, entretanto, também podem polinizar efetivamente a espécie devido a sua assiduidade nas flores. Abelhas pequenas contataram os estigmas somente esporadicamente.

3.2. *Limnocharis flava*

As flores de *L. flava* são grandes com três sépalas de coloração verde-pálida com 0,9 a 1,4 cm de comprimento (n=10) e três pétalas amarelo esmaecidas com 1,7 a 2,5 cm de comprimento (n=10) e base das pétalas amarelo-escura. O diâmetro da flor mede entre 3,2 e 4,4 cm (n=10) (tabela 1; fig.2). O androceu é formado por estaminódios amarelos com ápice acuminado e estames férteis com anteras dorsifixas com abertura extrosa. As peças do androceu são inseridas em espiral no receptáculo floral. O androceu contém entre 66 e 90 estaminódios e entre 24 e 45 estames férteis. Os estaminódios recobrem os estames férteis formando uma câmara de pólen. Estames dos ciclos mais internos apresentam anteras maiores e filetes mais curtos comparados aos externos (fig. 2). O gineceu é formado por 15 a 21 carpelos semi-fusionados, e no ápice de cada carpelo localiza-se o estigma séssil em formato de fenda. Os estigmas já foram receptivos na abertura das flores. As flores abriram sincronicamente entre 5:30 e 7:00 e fecharam entre 11:30 e 13:00. Cada flor produziu em média 2329 ± 915 óvulos e 247773 ± 76996 grãos de pólen, o que resultou em 113 ± 33 grãos de pólen por óvulo (tabela1).

Durante seis meses de observação uma planta produziu entre uma e 22 inflorescências grandes, mais altas que os pecíolos das folhas, que contaram com 7 a 13 flores que abriram uma a cada dia após a abertura da primeira flor. Pseudoviviparidade foi observada somente em algumas inflorescências, onde plântulas cresceram a partir do ápice da inflorescência depois que os frutos maduros se desprenderam.

As plantas das três populações estudadas foram autocompatíveis e 100% das flores polinizadas manualmente resultaram em frutos. Não houve formação de frutos no experimento de apomixia (tabela 3). As poucas flores controle na natureza e no jardim experimental que não desenvolveram frutos foram predados por um pequeno Curculionidae que perfurou os frutos em desenvolvimento ou sofreram danos provocados por operários de *T. spinipes*. Após a maturação dos frutos que durou entre 20 a 25 dias, caíram das inflorescências e os carpelos se soltaram liberando as sementes. O número médio de sementes em frutos provenientes de todos os experimentos não diferiu entre os tratamentos nem em frutos provenientes das flores controle (ANOVA

$F(3, 36)=0.96513, p=0.41976$) (tabela 4; fig. 3).

As flores de *L. flava* foram pouco visitadas nas quatro localidades estudadas. Somente *T. spinipes* foi considerada abundante em São Lourenço da Mata (tabela 5) onde a população tinha muitas flores disponíveis e foi intensamente visitada por operárias de um ninho próximo a área de observação. As operárias de *T. spinipes* cortaram com as mandíbulas os estaminódios e tiveram acesso as anteras que muitas vezes foram coletadas por inteiro. Em Morada Nova, São Lourenço da Mata e Vale das Pedreiras foram observadas fêmeas de *P. palpalis*, os únicos visitantes florais que adentraram a câmara de pólen para coletar pólen e néctar. Abelhas pequenas de *Dialictus*, *Pereirapis* e *Plebeia* coletaram grãos de pólen ou após visitas de *Protodiscelis* ou nas poucas flores em que as anteras ficaram a mostra.

3.3. *Limnocharis laforestii*

As flores da população de Alto Araguaia foram menores, com diâmetro variando entre 15 e 22mm (n=7), já as de Goiana tiveram flores entre 20 e 30mm de diâmetro (n=10). As três sépalas tiveram comprimento entre 4 e 8 mm (n=7) na população de Alto Araguaia e 6 a 10 mm na população de Goiana. As flores tiveram coloração amarelo-esmaecida, entretanto mais forte que o de *L. flava* (tabela 1; fig. 2e). O androceu é formado por um a três ciclos de estaminódios e dois ciclos de estames férteis na população de Alto Araguaia e três a seis ciclos de estaminódios e dois a três ciclos de estames férteis na população de Goiana e Serra Negra do Norte. Os estaminódios não cobriram os estames férteis deixando algumas anteras expostas (fig. 2c, d). As anteras apresentaram tamanhos semelhantes. Na população de Alto Araguaia o androceu contou com 32 a 40 estaminódios e 16 a 19 estames férteis (n=10) e o gineceu composto por 14 a 19 carpelos. As flores da população de Goiana apresentaram 36 a 40 estaminódios e 25 a 40 estames férteis e o gineceu 15 a 21 carpelos (n=10) (tabela 1). O gineceu de *L. laforestii* é mais alongado que o de *L. flava* formando uma estrutura quase circular acuminada. No ápice de cada carpelo há o estigma séssil em formato de fenda, que apresenta uma torção no ápice dextrogira (fig. 2c). Os estigmas já foram receptivos no início da antese. As flores abriram sincronicamente e lentamente entre 8:00 e 9:00 com anteras ainda fechadas que deisceram cerca de 30 minutos depois. As flores fecharam entre 12:00 e 13:00hrs (n=30) em plantas das duas populações. Cada flor produziu em média 2553 ± 243 óvulos por flor na população de Alto Araguaia (n=4) e 3124 ± 320 na população de Goiana (n=10) e em média 184792 ± 62156 grãos de pólen na população de

Alto-Araguaia e 287500 ± 53662 na população de Goiana. A razão pólen óvulo na população de Alto Araguaia foi de 72 ± 9 grãos de pólen por óvulo e na população de Goiana de 92 ± 6 grãos de pólen por óvulo (tabela 1).

Cada inflorescência produziu em média 7 (4 a 8) flores ($n=30$) na população de Alto Araguaia e entre 7 e 13 flores na população de Goiana e Serra Negra do Norte ($n=10$). A inflorescência cresce ereta perpendicular à água durante 8 a 10 dias ($n=4$). Depois da abertura da primeira flor, disponibilizou diariamente somente uma nova flor ($n=56$). Após a abertura de todas as flores, o peso dos frutos abaixa a inflorescência que flutua na água ($n=30$). Frutos não necessitam de contato com a água para o desenvolvimento. Oito inflorescências escoradas com estacas de madeira desenvolveram frutos normalmente. Plantas da população de Alto Araguaia produziram entre duas e 30 inflorescências ($n=18$ plantas) durante seis meses de observação. Indivíduos da população de Goiana, entre 2 e 15 inflorescências ($n=12$). Já na população de Serra Negra do Norte durante 20 dias em junho de 2008, foram observadas 22 plantas que tiveram entre 1 e 13 inflorescências por planta. Os frutos cresceram rapidamente, protegidos pelas sépalas, e no oitavo dia alcançaram o tamanho total de amadurecimento. Os frutos amadureceram entre 20 e 25 dias ($n=30$) e se desprenderam do pedúnculo liberando cada carpelo individualmente. Os carpelos permaneceram boiando na superfície da água.

As flores de *Limnocharis laforestii* das populações estudadas formaram frutos sem presença de visitantes florais. Em todos os tratamentos houve 100% de sucesso (tabela 3). Houve diferença significativa no número de sementes por fruto entre os tratamentos nas duas populações estudadas (tabela. 4; fig. 4 e 5). Na população de Goiana os frutos formados por autopolinização espontânea tiveram significativamente menos sementes que aqueles produzidos em frutos provenientes de polinização cruzada e das flores controle expostas aos visitantes. Não houve diferença entre o número de sementes após autopolinização manual e espontânea, entretanto, após polinização cruzada manual o número de sementes somente diferiu daquele proveniente de autopolinização espontânea (fig. 4). Na população de Alto Araguaia frutos provenientes de autopolinização espontânea tiveram significativamente menos sementes que aqueles do controle ou polinização cruzada (Kruskal-Wallis test: $H(2, N= 15) = 10.50000$ $p=0.0052$) (fig.5).

Foram observados apenas poucos visitantes florais na população de Alto

Araguaia de *L. laforestii*. Somente três indivíduos de uma espécie de *Dialictus* e um indivíduo de *T. spinipes* foram observados visitando flores durante seis horas de observação por dia. Na população de Goiana foi registrado entre um e quatro indivíduos de *P. palpalis* por meia hora de observação e uma visita de *Dialictus* sp.1 e duas de *Pereirapis* sp (tabela 5). Operárias de *T. spinipes* foram comuns em um dos dias de observação onde danificaram as flores, cortando com a mandíbula estaminódios, anteras e pétalas. Na população de Serra Negra do Norte, uma espécie de *Protodiscelis* ainda não descrita foi o visitante mais comum. Essa espécie teve comportamento semelhante ao de *P. palpalis* nas flores da população de Goiana. As abelhas adentraram os estaminódios e coletaram ativamente pólen e néctar. Cerca de 10 visitas dessa espécie foram observadas em cada 30min de coleta. No Jardim Experimental, as flores foram pouco visitadas e em um mês de observações diárias foram coletadas apenas operárias de *Plebeia* cf. *flavocincta*, *T. spinipes* e somente um indivíduo de *Dialictus* sp. 1. As operárias de *T. spinipes* também apresentaram comportamento destrutivo no Jardim experimental.

4. Discussão

Embora os atributos florais e ecologia da polinização de *Limnocharis flava*, *L. laforestii* e *Hydrocleys nymphoides* apresentem diferenças marcantes, nossos resultados mostram que as três espécies têm características reprodutivas que explicam sua ampla distribuição geográfica e, conseqüentemente, seu potencial como plantas invasoras em ambiente exótico: 1- as três espécies estudadas apresentam alta capacidade reprodutiva sexuada; 2- apesar de interagirem com polinizadores especializados, a ausência de abelhas oligoléticas não diminuiu a capacidade reprodutiva das espécies; 3- a presença de um filtro floral, com a presença de uma câmara de pólen formada por estaminódios longos, não explica limitações reprodutivas das espécies; 4- o conjunto de características de morfologia floral, sistema reprodutivo e interações com polinizadores explica o potencial invasor.

Espécies com sistema reprodutivo autogâmico normalmente apresentam distribuições geográficas naturais mais amplas que espécies filogeneticamente próximas obrigatoriamente xenogâmicas (Barrett, 2011). Autogamia também é uma característica comum em espécies ruderais e invasoras (Baker, 1955, 1965; Barrett, 2011). Aqui demonstramos que isso é válido para as limnocharitáceas. Não há registro como invasora para *Hydrocleys martii* que apresenta distribuição restrita ao nordeste do Brasil e

demonstra dependência reprodutiva de um polinizador oligolético (Haynes e Holm-Nielsen, 1992, Carvalho e Schlindwein, 2011). Já *L. flava*, *L. laforestii* e *H. nymphoides* são amplamente distribuídas nos neotrópicos (Haynes e Holm-Nielsen, 1992) e registros de sérias invasões de *L. flava* e *H. nymphoides* foram registradas (Waterhouse, 2003; Abhilash et al., 2008; Hastwell, 2008; Gordon e Gantz, 2010). Como o esperado as espécies do gênero *Limnocharis* foram autogâmicas e produziram grande número de sementes. Populações de *L. flava* invasoras na China também se mostraram autocompatíveis com grande produção de sementes mesmo na ausência de visitantes (Song et al 2000a).

As populações de *H. nymphoides* estudadas, entretanto, foram xenogâmicas. Nessa espécie a ausência de filtro floral e a interação com polinizadores generalistas abundantes e amplamente distribuídos como *Bombus brevivillus*, *Apis mellifera* e *Trigona spinipes* garantiram grande produção de sementes. No entanto, não é conhecido se outras populações nativas ou invasoras de *H. nymphoides* são autoincompatíveis. Em outras espécies de plantas aquáticas a quebra da autoincompatibilidade genética é reportada. *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms e *Eichornia paniculata* por exemplo, são importantes invasoras em regiões de clima temperado. Em ambiente nativo há maior frequência de populações e indivíduos autoincompatíveis polinizados por abelhas especialistas que transferem os grãos entre os três morfos florais dessas espécies tristílicas. Já populações e indivíduos autocompatíveis são mais comuns em ambiente exótico. Em populações invasoras há, principalmente em função de falta de polinizadores efetivos, seleção dirigida à autocompatibilidade com a perda da tristilia e exacerbada reprodução clonal (Barrett, 1979; Barrett e Husband, 1990; Barrett et al., 1993). Por isto, valeria a pena verificar o status da incompatibilidade em populações invasoras de *H. nymphoides*.

Morfologicamente as flores de *L. flava* são especializadas, tal como as de *H. martii* (Carvalho e Schlindwein, 2011). Os numerosos estaminódios nessa espécie funcionam como filtro floral seletivo a visitantes não especializados. Apesar da baixa frequência de visitas florais, somente indivíduos da espécie oligolética *P. palpalis* foram eficientes na transferência de grãos de pólen entre as flores. As nossas observações indicam que outras espécies de abelhas devem ter pouca importância na polinização de *L. flava*.

Nas flores de *L. laforestii*, apesar da presença de estaminódios, não há a

formação de uma câmara de pólen e abelhas pequenas de várias espécies são capazes de transferir os grãos de pólen. Na população de Goiana, abelhas de *P. palpalis* foram mais frequentes. Embora o número médio de sementes por fruto provenientes das flores cruzadas manualmente e do sucesso reprodutivo natural foram significativamente maiores nessa população que aqueles provenientes de autopolinização, não houve diminuição drástica na produção de sementes. Em flores da população de Serra Negra do Norte, abelhas de *Protodiscelis* sp. foram mais frequentes e devem garantir altas taxas de reprodução cruzada nessa população, que se localiza em um ambiente semiárido, altamente sazonal. Nessa população *L. laforestii* é anual. As condições ambientais das populações de Santa Rita do Araguaia e de Goiana são muito diferentes. Nessas, as plantas são perenes, pois crescem próximas a rios perenes e há pouca variação dos níveis de água durante todo o ano.

As três espécies estudadas apresentam flores tipicamente melitófilas e somente abelhas polinizaram as flores no ambiente nativo, como já mostrado para *H. martii* (Carvalho e Schlindwein, 2011). As sugestões anteriores, no entanto, apontaram para polinização por moscas ou borboletas (Haynes e Holm-Nielsen, 1992; Haynes et al., 1998). Nossos resultados indicam que todas as espécies neotropicais do clado limnocharitaceas de Alismataceae são polinizadas por abelhas, principalmente do gênero *Protodiscelis*. Entretanto, esse grupo especializado de abelhas não limita a reprodução sexuada nas espécies autocompatíveis estudadas. Espécies de *Echinodorus* (Alismataceae) também são visitadas por abelhas desse gênero (Vieira e Lima, 1997, Carvalho e Schlindwein, não publicado).

A morfologia das sementes dos representantes do clado limnocharitaceas é semelhante. Todas as espécies apresentam sementes pequenas, embriões curvados e ausência de endosperma (Haynes e Holm-Nielsen, 1992). São dispersas pela água em curta distância ou provavelmente aderem a penas ou pernas de pássaros em dispersão a longa distância, tal como outras espécies de macrófitas aquáticas (Husband e Barrett, 1991; Barrett et al., 1993). A capacidade de produção de sementes no gênero *Limnocharis* é espantosamente alta principalmente quando comparada a de *H. martii*. Cada inflorescência de *H. martii* apresenta em média 7,5 flores, que produziram em média 232 sementes por flor resultando em 1740 sementes por inflorescência (Carvalho e Schlindwein, 2011). Admitindo uma taxa de frutificação de 85,5%, como encontrado no referido trabalho, uma inflorescência produziria aproximadamente 1488 sementes.

Caso essa multiplicação seja feita com a probabilidade de 2% tal como observado em flores expostas a visitantes florais na ausência do polinizador oligolético, o número de sementes se reduz para aproximadamente 35 sementes por inflorescência. Já para *L. flava* e *L. laforestii* admitindo somente uma única inflorescência em frutos oriundos de autopolinização espontânea, *L. flava* produziria 8310 sementes e *L. laforestii* da população de Goiana 8806 e da população de Alto Araguaia 2513. Dessa forma o número de sementes é entre 72 e 253 vezes maior que o produzido por *H. martii* nas mesmas condições. Cabe ressaltar que as populações de *H. martii* na caatinga são mantidas unicamente por sementes. Já as espécies de *Limnocharis* são perenes e permanecem vivas durante um longo período produzindo maciçamente sementes dispersadas rapidamente. *L. flava* ainda se reproduz por pseudoviviparidade através do brotamento de plântulas no ápice das inflorescências velhas. Em ambientes com níveis constantes de água, tal como em plantações de arroz e alagados perenes (Waterhouse, 2003), essa espécie torna-se de difícil combate.

Agradecimentos

Agradecemos a Lucas Viegas, Adauto Alex dos Santos, Poliana Ojima e Ricardo Camargo pela ajuda no trabalho de campo, Rodrigo O. C. Carvalho pelo apoio logístico e Hartmut Hilger (FU Berlin) pela utilização do microscópio eletrônico de varredura. Agradecemos ao ICMBio pela licença de coleta, ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) pelo auxílio concedido (Universal) e bolsas a ATC e CS e ao CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por uma bolsa a CS.

Referencias

- Abhilash, P. C., Singh N, Syllas V.P., Kumar, B.A., Mathew, J.C., Satheesh, R. Thomas, A.P., 2008. Eco-distribution mapping of invasive weed *Limnocharis flava* (L.) Buchenau using Geographical Information System: implications for containment and integrated weed management for ecosystem conservation. *Taiwania*, 53, 30-41.
- APG III., 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* 161, 105-121.
- Baker, H.G., 1955. Self-compatibility and establishment after long distance dispersal. *Evolution*. 9, 347-349.

- Baker, H.G., 1965. Characteristics and modes of origin of weeds. In: Baker, H.G., Stebbins, G.L. (Eds.), *The genetics of colonizing species*. Academic Press, New York, pp. 147-168.
- Baker H.G. 1974. The evolution of weeds. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 5, 1-24.
- Barrett, S. C. H., 1979. The Evolutionary breakdown of tristily in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms Water Hyacinth. *Evolution*. 33: 499-510.
- Barrett, S.C.H., 2011. Why reproductive systems matter for the invasion biology of plants. In: Richardson, D.M., (Ed). *Fifty years of invasion ecology: The legacy of Charles Elton*. Oxford University Press, Oxford, pp. 195-210.
- Barrett, S. C. H., Husband, B., 1990. Variation in outcrossing rates in *Eichhornia paniculata*: the role of demographic and reproductive factors. *Plant Species Biol.* 5: 41-55.
- Barrett, S.C.H., Eckert, C.G., Husband, B.C., 1993. Evolutionary processes in aquatic plant populations. *Aquat. Bot.* 44, 105-145.
- Beest, M., Le Roux, J.J., Richardson, D.M., Brysting, A.K., Suda, J., Kubešová, M., Pyšek, P., 2012. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Ann. Bot.* 109, 19-45.
- Bossdorf, O., Auge, H., Lafuma, L., Rogers, W.E., Siemann, E., Prati, D., 2005. Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia*. 144, 1–11.
- Cane, J.H., Eickwort, G.C., Wesley, F.R., Spielholz, J., 1985. Pollination ecology of *Vaccinium stamineum* (Ericaceae: Vaccinioideae). *Am. J. Bot.* 72, 135–142.
- Cane, J.H., Sipes, S., 2006. Characterizing Floral Specialization by Bees: Analytical Methods and Revised Lexicon for Oligolecty. In: Waser, N.M., Ollerton, J. (Eds.). *Plant-Pollination Interactions: From specialization to Generalization*. The University of Chicago Press, Chicago, pp. 99-121.
- Carvalho, A.T., Schlindwein, C., 2011. Obligate association of an oligolectic bee and a seasonal aquatic herb in semi-arid north-eastern Brazil. *Biol. J. Linn Soc.* 102, 355–368.

- Chen, L., Chen, J., Gituru, R.W., Temam, T.D., Wang, Q., 2012. Generic phylogeny and historical biogeography of Alismataceae, inferred from multiple DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 63, 407-416.
- Daehler, C.C., 1998. The taxonomic distribution of invasive angiosperm plants: ecological insights and comparison to agricultural weeds. *Biol. Cons.* 84, 167-180.
- Elton, C.S., 1958. *The Ecology of Invasions by Animals and Plants*. Methuen, London.
- Gaston, K.J., 1996. Species range-size distributions: patterns, mechanisms and implications. *Trends Ecol. Evol.* 11, 197-201.
- Gordon, D.R., Gantz, C.A., 2011. Risk assessment for invasiveness differs for aquatic and terrestrial plant species. *Biol. Invasions.* 13, 1829-1842.
- Hastwell, G.T., Daniel, A.J., Vivian-Smith, G., 2008. Predicting invasiveness in exotic species: do subtropical native and invasive exotic aquatic plants differ in their growth responses to macronutrients? *Diversity and Distributions*, 14, 243-251.
- Haynes, R.R., Holm-Nielsen, L.B., 1992. The Limnocharitaceae. *Flora Neotropica Monographs*. New York Botanical Garden, New York 56:1-32.
- Haynes, R.R., Les, D.H., Holm-Nielsen, L.B., 1998. Alismataceae. In: Kubitzki, K., Huber, H., Rudall, P.J., Stevens, P.S., Stützel, T. (Eds) *The Families and Genera of Vascular Plants*, vol. IV. Flowering Plants. Monocotyledons, Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). Springer Verlag, Berlin, pp 271-275.
- Husband, B.C., Barrett, S.C.H., 1991. Colonization history and population genetic structure in *Eichhornia paniculata*. *Heredity* 66, 287-296.
- Kearns, C.A., Inouye, D.W., 1993. *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, Colorado.
- Lowry, E., Lester, S.E., 2006. The biogeography of plant reproduction: potential determinants of species' range sizes. *J. Biogeography.* 33, 1975-1982.
- MacRoberts, M.H., MacRoberts, B.R., 2010. *Hydrocleys nymphoides* (Limnocharitaceae): New to Louisiana. *Phytoneuron* 29: 1-2.

Matias, L., Sousa, D.J.L., 2011. Alismataceae no estado do Ceará, Brasil. Rodriguésia 62: 887-900 (Em português).

Milet-Pinheiro, P., Schlindwein, C., 2010. Mutual reproductive dependence of distylic *Cordia leucocephala* (Cordiaceae) and oligolectic *Ceblurgus longipalpis* (Halictidae, Rophitinae) in the Caatinga. Ann. Bot. 106, 17-27.

Nature Serve Explorer. 2012. NatureServe Database USA. Disponível em <http://www.natureserve.org/explorer/>

Pannel, J.R., Barrett, S.C.H., 1998. Baker's Law revisited: reproductive assurance in a metapopulation. Evolution 52, 657-668.

Praz, C.J., Müller, A., Dorn, S., 2008. Host recognition in a pollen-specialist bee: evidence for a genetic basis. Apidologie 39:547-557.

Prentis, P.J., Wilson , J.R.U., Dormontt , E.E., Richardson, D.M., Lowe, A.J., 2008 Adaptive evolution in invasive species. Trends Plant. Sci.13, 288-294

Richardson, D.M., Pysek, P., 2008. Fifty years of invasion ecology: the legacy of Charles Elton. Diversity and Distributions 14: 161-168.

Robertson, C., 1925. Heterotropic bees. Ecology 6, 412-436.

Schlindwein, C., Wittmann, D., 1995. Specialized solitary bees as effective pollinators of South Brazilian species of *Notocactus* and *Gymnocalycium* (Cactaceae). Bradleya 13, 25-34.

Schlindwein. C., Wittmann, D., 1997a. Stamen movements in flowers of *Opuntia* (Cactaceae) favour oligolectic pollinators. Plant Syst. Evol. 204, 179-193.

Schlindwein. C., Wittmann, D., 1997b. Micro foraging routes of *Bicolletes pampeana* (Colletidae) and bee induced pollen presentation in *Cajophora arechavaletae* (Loasaceae). Bot. Acta. 110, 177-183.

Schlindwein, C., Wittmann, D., Martins, C.F., Hamm, A., Siqueira, J.A., Schiffler, D., Machado, I.C., 2005. Pollination of *Campanula rapunculus* L. (Campanulaceae): How

much pollen flows into pollination and into reproduction of oligolectic pollinators?
Plant Syst. Evol. 250, 147-156.

Song, Z., Guo, Y.H., Huang, S.Q., 2000a. Studies on the breeding system of *Limnocharis flava* (Butomaceae). *Acta Phyto Sinica*, 38, 53-9 (Chinese, English abstract).

Song, Z.P., Wang, X., Pan, M., 2000b. A comparative study on population genetic structure and breeding system between *Butomus umbelatus* and *Limnocharis flava* (Butomaceae). *J. Wuhan Bot. Res.* 18, 91-98 (Chinese, English abstract)

USDA, NRCS. 2012. The PLANTS Database. National Plant Data Center, Baton Rouge, La. Acessível em <http://plants.usda.gov>.

Waterhouse, B. M.. 2003. Know your enemy: recent records of potentially serious weeds in northern Australia, Papua New Guinea and Papua (Indonesia). *Telopea* 10, 477-485.

TABELAS

Tabela 1: Características da biologia floral, duração de antese, medidas florais, quantificação de estames e estaminódios, grãos de pólen, óvulos e carpelos de *Hydrocleys nymphoides*, *Limnocharis flava* e *L. laforestii* de diferentes localidades no Brasil. [n] indica o número de flores ou inflorescências analisadas.

	<i>Hydrocleys nymphoides</i>	<i>Limnocharis flava</i>	<i>Limnocharis laforestii</i>
Horário de abertura das flores	6:30-7:00 hrs [30]	5:30-7:00 hrs [23]	8:00-9:00 hrs [20]
Horário de fechamento	12:00-13:00hrs [30]	11:30-13:00 [23]	12:00-12:30 hrs [20]
Diâmetro da abertura da flor (Max-min, cm)	3,5-5,0 [10]	3,2 -4,4 [10]	1,5-3,0 [17]
Estames por flor (max-min; moda)	24-38; 28 [10]	24-45; 42	16-40; 25[20]
Estaminódios por flor (maxi-min; moda)	30-38, 32 [10]	66-90; 79 [20]	32-40; 36 [20]
Número de grãos de pólen por flor (média±dp)	297343±41059 [12]	247773±76996 [10]	236146±76563 [9]
Carpelos por flor (max-min; moda)	6-9; 8 [12]	15-21; 18 [22]	14-21; 19 [30]
Óvulos por flor (média±dp)	1383±182 [12]	2329±915 [22]	2781±377 [14]
Razão pólen óvulo (média±dp)	224±46	113±33	85,5±15,1 [14]
Flores por inflorescência (max-min; moda)	4-5; 5 [50]	7-13; 10 [40]	4-13; 7 [30]
Inflorescências por planta (max-mim; moda)	-	1-22; 8 [15]	2-30; 8 [10]
Tempo de amadurecimento dos frutos	19-28 dias [10]	20-25 dias [10]	20-25 dias [10]

Tabela 2: Comprimento das anteras dos quatro ciclos de estames férteis em *Hydrocleys nymphoides*. O primeiro até terceiro ciclo é composto exclusivamente por estaminódios e as primeiras anteras aparecem no quarto ciclo (n=10 flores, 290 anteras).

	Anteras férteis (mm)			
	4º Ciclo	5º Ciclo	6º Ciclo	7º Ciclo
Média	2,52	4,13	4,77	5,63
dp	0,27	0,45	0,24	0,37
Máximo	2,93	4,8	5,14	6,43
Mínimo	2,21	3,31	4,47	5,23

Tabela 3: Sistema reprodutivo e sucesso reprodutivo em condições naturais e no jardim experimental em três espécies de Alismataceae de diferentes populações de Pernambuco, Paraíba e Mato Grosso, Brasil. Controle natureza = Flores acessíveis para visitantes florais na população original, Controle jardim = Flores acessíveis para visitantes florais de plantas cultivadas no Jardim Experimental em Camaragibe, Pernambuco.

Espécie	Tratamento					
	Frutos formados, [N], %de frutos formados					
População estudada	Auto-polinização Espontânea	Auto-polinização Manual	Apomixia	Polinização Cruzada	Controle natureza	Controle Jardim
<i>Hydrocleys nymphoides</i>						
Jaboatão dos Guararapes, PE	0 [15] 0%	0 [12] 0%	-	7 [10] 70%	9 [15] 60%	7 [15] 46,7%
Cruz do Espírito Santo, PB	0 [15] 0%	1 [10] 0%	-	10 [10] 100%	8 [13] 61,5%	10 [15] 66,7%
<i>Limnocharis flava</i>						
Morada Nova, Recife, PE	39 [39] 100%	7 [7] 100%	0 [9] 0%	13 [13] 100%	124 [125] 99,2%	30 [30] 100%
Curado, Recife, PE	140 [140] 100%	14 [14] 100%	-	4 [4] 100%	151 [153] 98,7%	29 [30] 96,7%
Bayeux, PB	21 [21] 100%	3 [3] 100%	-	-	14 [15] 93,7%	12 [12] 100%
<i>Limnocharis laforestii</i>						
Alto Araguaia, MT	72 [72] 100%	9 [9] 100%	-	12 [12] 100%	-	70 [70] 100%
Goiana, PE	30 [30] 100%	6 [6] 100%	-	2 [2] 100%	143 [143] 100%	-

Tabela 4: Número de sementes produzidas por fruto provenientes dos experimentos de polinização controlada em duas populações de *Limnocharis laforestii* (Goiana-Pernambuco, Alto Araguaia-Goiás) e *L. flava* no nordeste do Brasil (n=10 frutos por experimento). Os frutos do controle foram coletados em condições naturais (média±dp).

	Autopolinização manual	Polinização espontânea	Cruzado	Controle
<i>L. laforestii</i> (Goiana)	967±426	1258±240	1612±273	1680±215
<i>L. laforestii</i> (Alto Araguaia)	-	359±58	780±189	641±63
<i>L. flava</i>	924±262	831±315	1100±206	1025±391

Tabela 5: Visitantes florais de *Hydrocleys nymphoides*, *Limnocharis flava* e *L. laforesti* (Alismataceae) em vários locais no Brasil. Legendas –A= Abundante: 10 ou mais indivíduos coletadas por 30 minutos; C= Comum: 3- 9 indivíduos; R= Raro: 1-2 indivíduos.

Apidae					Halictidae					Colletidae		
Visitantes florais	<i>Apis mellifera</i>	<i>Bombus brevivillus</i>	<i>Plebeia cf. flavocincta</i>	<i>Trigona spinipes</i>	<i>Augochlora</i> sp1	<i>Augochlora</i> sp2	<i>Dialictus</i> sp.1	<i>Dialictus</i> sp.2	<i>Pereirapis</i> sp.	<i>Pseudaugochlora graminea</i>	<i>Protodiscelis palpalis</i>	<i>Protodiscelis</i> sp.
Espécie												
<i>Hydrocleys nymphoides</i>												
Jaboatão dos Guararapes, PE	A	A	C	A	R						R	
Cruz do Espírito Santo, PB	A	R	C	A		E				C	R	
São Lourenço da Mata, PE	A	A		A			C					
Dois Irmãos, Recife, PE	A			A			C		A			
<i>Limonocharis flava</i>												
Morada Nova, Recife, PE			C						R		R	
Curado, Recife, PE			C	C								
Bayeux, PB							R					
São Lourenço da Mata, PE			C	A							C	
Vale das Pedreiras, Camaragibe, PE			R				R				C	
<i>Limnocharis laforestii</i>												
Alto Araguaia, MT				R				R				
Goiana, PE				C			R		R		C	
Serra Negra do Norte, RN	R											C

FIGURAS



Figura 1: *Hydrocleys nymphoides* (Alismataceae) da população de Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco Brasil. A - Habitat e detalhe da flor sendo visitada por *Protodiscelis palpalis*; C – Flor em corte longitudinal, notar os estaminódios finos e pequenos; D – Diferenças no tamanho dos estames, da esquerda para direita ciclos mais externos para internos.



Figura 2: *Limnocharis flava* e *L. laforestii*. A- Estigma sésstil em *L. flava* (SEM); B- Botão floral de *L. flava*, notar os estaminódios maiores que os estames férteis e o ovário com as suturas carpelares (SEM); C- Botão floral de *L. laforestii* notar os estaminódios não recobrem as anteras, e torção dos estigmas para direita; D- Flor aberta de *L. laforestii* da população de Santa Rita do Araguaia, Goiás, Brasil; E- A esquerda da foto flor de *L. laforestii* da população de Goiana, Pernambuco, a direita flor de *L. flava* população de Morada Nova, Recife, Pernambuco, notar a diferença de coloração das flores e formato do botão floral; F- Habitat da *L. laforestii* em Santa Rita do Araguaia, Goiás, Brasil.

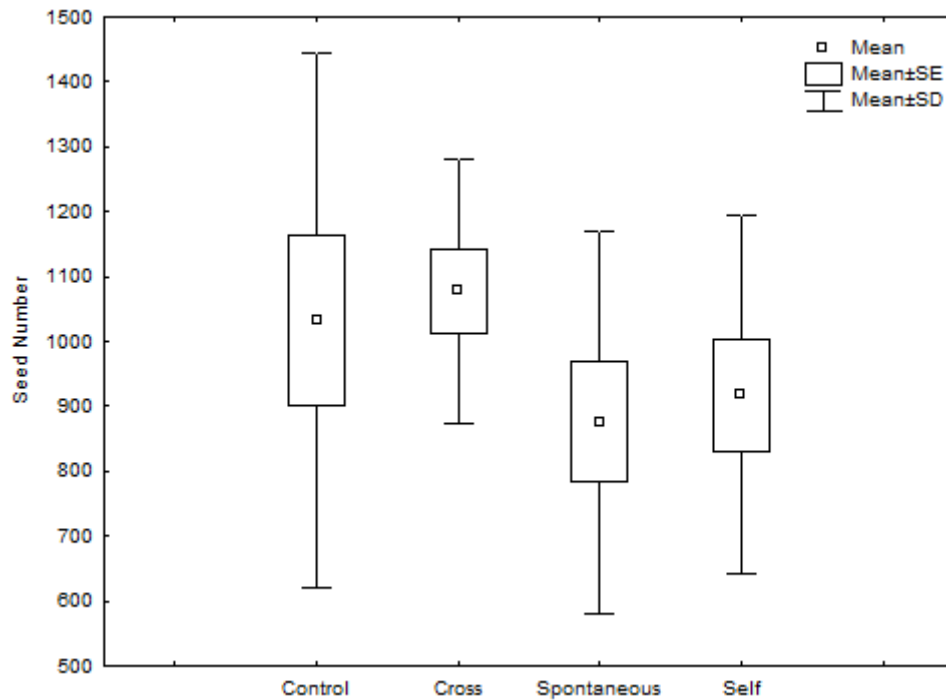


Figura 3: Número de sementes por fruto (n=10) oriundos dos experimentos de polinização e do sucesso reprodutivo (control) em *Limnocharis flava* (Alismataceae). Não houve diferença significativa entre os tratamentos ANOVA $F(3, 36)=0.96513$, $p=0.41976$. Cross = polinização cruzada manual, Spontaneous = autopolinização espontânea, self = autopolinização manual. Teste *a posteriori* de Tukey.

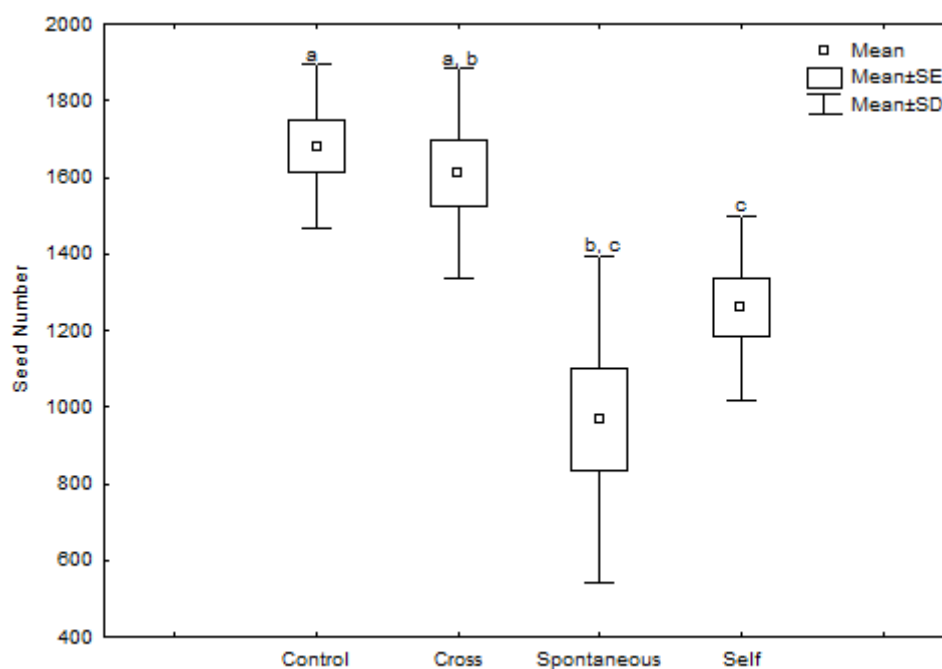


Figura 4: Número de sementes por fruto (n=10) oriundos dos experimentos de polinização e do sucesso reprodutivo (control) em *Limnocharis laforestii* (Alismataceae) provenientes da população de Goiana, Pernambuco. Letras diferentes denotam diferenças significativas. ANOVA: $F(3, 36)=12.170$, $p=0.0001$; aXb $p=0,0001$; bXc $p=0,0003$. Cross = polinização cruzada manual, Spontaneous = autopolinização espontânea, self = autopolinização manual. Teste *a posteriori* de Tukey.

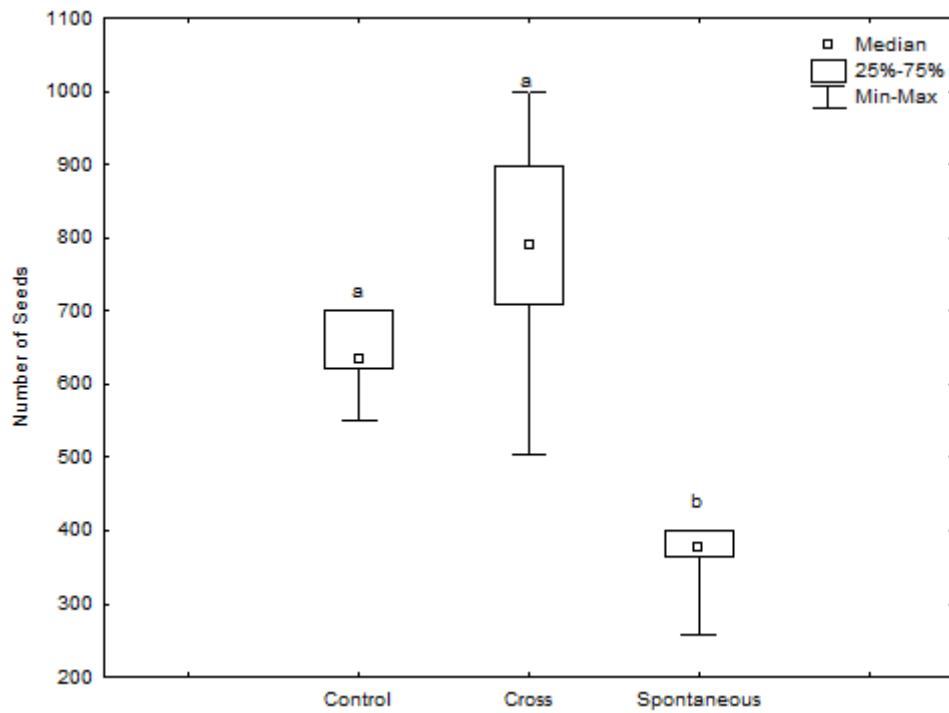


Figura5: Número de sementes por fruto (n=5) oriundos dos experimentos de polinização e do sucesso reprodutivo (control) em *Limnorcharis laforestii* (Alismataceae) provenientes da população de Alto Araguaia, Goiás. Letras diferentes denotam diferenças significativas. Kruskal-Wallis test: $H(2, N= 15) = 10.50000$ $p = 0.0052$. Cross = polinização cruzada manual, Spontaneous = autopolinização espontânea,

5.3 Manuscrito

A ser submetido à revista *Botanical Journal of the Linnean Society*

Artigo original

Sozinho, um volátil floral benzenéide atrai o polinizador em uma relação interdependente entre abelha oligolética-planta

AIRTON TORRES CARVALHO^{1*} STEFAN DÖRTERL² e CLEMENS SCHLINDWEIN³

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, 58059-900 João Pessoa, PB, Brazil

²Department of Plant Systematic, University of Bayreuth 95440, Germany

³Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

Título corrido: Atração de *Protodiscelis palpalis* por ρ -methylanisole

Autor para correspondência: Airton Torres Carvalho

*Endereço eletrônico: carvalhoairton@yahoo.com.br

Resumo

É provável que marcadores florais taxon-específicos permitam que as abelhas oligoléticas reconheçam suas plantas hospedeiras. Voláteis florais são reconhecidamente importantes canais de comunicação entre plantas e polinizadores. A interação entre *Hydrocleys martii* (Alismataceae) e *Protodiscelis palpalis* (Colletidae, Neopasiphaeinae) é interdependente em ambientes semiáridos no Nordeste do Brasil, embora na região de Floresta Atlântica essa mesma abelha visite flores de *Hydrocleys nymphoides*. Utilizamos a técnica de *headspace* dinâmico e GC-MS para caracterizar os voláteis emitidos por flores dessas duas espécies e testamos em ensaios no campo a atratividade dos principais compostos dos buquês florais na atratividade de abelhas de *P. palpalis*. As flores de *H. martii* produziram 22 compostos e *H. nymphoides* 13. Cada espécie, apesar de vários compostos em comum, tem seu perfil de odores característico. Benzenóides metoxilados foram os principais componentes dos buquês e *p*-metilanisole foi dominante em *H. martii* e 3,4-dimetoxitolueno em *H. nymphoides*. Os compostos florais *p*-metilanisole, 2-metoxi-4-metilfenol, 3,4-dimetoxitolueno, 3,4,5-trimetoxitolueno e methyl salicilate foram testados no campo em flores artificiais construídas com fita adesiva amarela e azul. Somente *p*-metilanisole atraiu significativamente mais abelhas à flores artificiais das duas cores comparadas com as de controle. Os nossos resultados, obtidos pela primeira vez para abelhas oligoléticas em ambiente natural, mostram que um único composto volátil atrai fêmeas de *P. palpalis* demonstrando que é o mais importante canal de comunicação entre *P. palpalis* e as flores de *H. martii* e *H. nymphoides*. Nossos resultados reforçam que os compostos voláteis específicos do buquê de flores são cruciais para a localização de plantas hospedeiras por abelhas oligoléticas.

PALAVRAS-CHAVE ADICIONAIS: *Protodiscelis* – Colletidae – Paracolletinae - perfumes florais – odores – polinização – oligoletia – semioquímicos – Caatinga - localização de hospedeiro

INTRODUÇÃO

Compostos voláteis produzidos por flores são importantes no desencadeamento da atração de polinizadores em mutualismos inseto-plantas (Chittka & Raine, 2006; Raguso, 2008). Em alguns sistemas de polinização especializados, tais como o entre figos e vespas dos figos (Chen *et al.*, 2009), compostos voláteis florais específicos são conhecidos por mediar a comunicação com polinizadores especializados. Tais compostos únicos que atraem uma única espécie de polinizador foram chamados de "canais privados de comunicação" (Raguso, 2003; Chen *et al.*, 2009, Soler *et al.*, 2010). Por outro lado, outras relações especializadas, como a de orquídeas e abelhas Euglossini (Dressler, 1982; Roubik & Hanson, 2004), são mediadas por uma mistura de compostos amplamente distribuídos em buquês florais de várias espécies vegetais (Schiestl *et al.*, 1999; Svensson *et al.*, 2010). Curiosamente, a maioria destes compostos também tem sido frequentemente reportada na atração de insetos polinizadores em diferentes interações plantas-polinizadores (Dobson, 2006; Carvalho *et al.*, 2012).

Abelhas oligoléticas restringem a dieta de pólen de suas larvas a espécies de plantas do mesmo gênero ou família (Robertson, 1925; Cane & Sipes, 2006). Mas como estes especialistas de pólen encontram suas plantas hospedeiras específicas? É mais provável que marcadores florais taxon-específicos permitam que as abelhas oligoléticas distingam plantas hospedeiras de não-hospedeiras (Dötterl & Vereecken, 2010). Para *Colletes fulgidus* Swenk, 1904 (Colletidae), uma espécie oligolética em flores de Asteraceae na América do Norte, Dobson (1987) especulou que compostos florais específicos mediarium e guiarium a abelha na procura das flores de suas hospedeiras. Mais tarde, alguns estudos confirmaram que a presença de determinados compostos voláteis em complexos buquês florais de plantas hospedeiras seriam os responsáveis pelo encontro e reconhecimento por parte das abelhas oligoléticas das suas plantas hospedeiras. Estas primeiras indicações referem-se às espécies dos gêneros *Chelostoma* (Megachilidae) (Dobson & Bergström, 2000), *Andrena* (Andrenidae) (Dötterl *et al.*, 2005) e *Hoplitis* (Megachilidae) (Burger *et al.*, 2010). Estes estudos também indicaram que, além de pistas olfativas complexas (formadas pela mistura de odores das hospedeiras), também sinais visuais estão envolvidos na localização e reconhecimento das flores (Dobson & Bergström, 2000; Burger *et al.*, 2010; Dötterl *et al.*, 2011; Milet-Pinheiro *et al.*, 2012).

A subfamília Neopasiphaeinae (Hymenoptera, Colletidae), segundo nova definição (Almeida *et al.*, 2012), inclui a maioria dos taxa de Paracolletini *sensu* Michener (2007). Informações sobre relações alimentares nesse grupo indicam que todos os representantes neotropicais são oligoléticos (Schlindwein & Wittmann, 1997a, b; Schlindwein, 1998, 2004).

Estreitamente oligolética, a espécie *Protodiscelis palpalis* (Ducke, 1908) (Colletidae, Neopasiphaeinae) forma uma associação altamente especializada com a sua planta aquática hospedeira *Hydrocleys martii* Seub. (Alismataceae *sensu* APGIII, 2009) (Carvalho & Schlindwein, 2011). Ambas espécies são comuns, mas altamente sazonais em corpos d'água efêmeros que surgem somente após as pesadas e irregulares chuvas na Caatinga (Carvalho & Schlindwein, 2011); uma floresta seca, com abundantes arbustos espinhosos e plantas suculentas, ocorrente no Nordeste do Brasil (Prado, 2003). Dado que ambas espécies de planta e abelha mostram interdependência reprodutiva, esta associação é um bom candidato para investigação do papel de aromas florais no encontro entre abelhas oligoléticas e seus hospedeiros.

Alguns espécimes de *P. palpalis* também visitam flores de *Hydrocleys nymphoides* (Willd.) Buchenau que ocorre na região costeira úmida do Nordeste do Brasil e que mostra padrões de floração semelhantes (Haynes & Holm-Nielsen, 1992, Carvalho & Schlindwein não publicado). Enquanto a ocorrência de *H. martii* é quase restrita à Caatinga, *H. nymphoides* é comum em diversas regiões neotropias, mas não ocorre na região de Caatinga (Haynes & Holm-Nielsen, 1992). Diferentemente de *H. martii*, suas flores são polinizadas por abelhas poliléticas de grande porte e amplamente distribuídas (Carvalho & Schlindwein, não publicado).

Neste estudo, identificamos os voláteis florais de *H. martii* e *H. nymphoides* e testamos em campo a eficácia individual dos principais componentes dos buquês florais na atração de fêmeas de *P. palpalis*. Perguntamos: 1) Quais compostos voláteis são produzidos por flores de *H. martii* e *H. nymphoides*; 2) Será que os perfis de aromas das duas espécies se sobrepõem?; 3) Os principais compostos produzidos por flores de *Hydrocleys* são envolvidos na atração de abelhas de *P. palpalis*?

MÉTODOS

ESPÉCIES DE PLANTAS ESTUDADAS E LOCIAS DE ESTUDO

Hydrocleys martii é distribuída exclusivamente no Brasil, essencialmente na região da Caatinga que é caracterizada por um clima fortemente sazonal, com chuvas concentradas em poucos meses do ano e que podem variar drasticamente em volume (de 100 a 900 mm) (Andrade-Lima, 1981; Prado, 2003). *Hydrocleys nymphoides* tem uma distribuição muito mais ampla, mas não ocorre no semiárido do Nordeste do Brasil (Haynes & Holm-Nielsen, 1992). No nordeste do Brasil, ocorre exclusivamente nas planícies costeiras, originalmente ocupadas por Floresta Tropical Atlântica, hoje reduzida a cerca de 5% de sua extensão original (Tabarelli *et al.*, 2007). Plantas das duas espécies de *Hydrocleys* ocorrem em corpos d'água superficiais, de águas estagnadas ou de baixo fluxo. Os

botões florais se desenvolvem dentro da água, crescem para fora da lamina de água e as flores abrem por um único dia. Em seguida submergem novamente para o desenvolvimento dos frutos. As flores de *H. martii* são um pouco menores que as de *H. nymphoides* e são de cor amarelo brilhante. As de *H. nymphoides* têm pétalas de cor bege pálido, com estaminódios avermelhados. As flores de *H. martii* apresentam um cone de estaminódios que cerram os estames férteis em uma câmara de pólen central. Apenas abelhas de *Protodiscelis palpalis* têm acesso à câmara de pólen e nectários escondidos pelos estaminódios (Carvalho & Schlindwein, 2011). Nas flores de *H. nymphoides*, os estaminódios são curtos e estreitos, não cobrindo os estames. Nessa espécie, as flores são polinizadas principalmente por operárias de abelhas poliléticas altamente sociais e amplamente distribuídas - *Bombus brevivillus*, *Trigona spinipes* e *Apis mellifera*, Apidae. Abelhas de *P. palpalis* são visitantes florais esporádicos e também coletam néctar e pólen nas flores (Carvalho & Schlindwein, não publicado).

O estudo foi realizado de Junho a Agosto de 2010, em quatro lagoas naturais da bacia hidrográfica do Rio Ipanema, em dois municípios de Pernambuco, Nordeste do Brasil. Lagoa 1 e 2 estavam no município de Pedra, Fazenda Lagoa do Chá (8°41'6"S e 36°54'48"W) e Fazenda Caboclo (8°42'35"S e 36°53'8"W), respectivamente; 3 e 4 no município de Venturosa, Vila da Carrapateira (8°36'42"S e 36°51'25"W) e na Fazenda das Areias (8°21'33"S e 36°44'20"W), respectivamente. Nestas quatro lagoas, vegetam apenas *H. martii* e *Echinodorus palaefolius* (Alismataceae), polinizadas por abelhas cogenéricas oligoléticas de *Protodiscelis alismatis* (Carvalho & Schlindwein 2011).

Para coleta de dados adicionais, plantas de *H. martii* e *H. nymphoides* foram cultivadas em um jardim experimental em Camaragibe, nas proximidades de Recife, Pernambuco. Os indivíduos de *H. martii* foram coletados nas lagoas 1 e 3, e os de *H. nymphoides* em um açude em Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco (08°05' 46"S e 35°03' 20"O). As plantas foram cultivadas em aquários de 50 ℓ, preenchidos com 10 ℓ de um substrato constituído por areia e terra de jardim (1:1) e 20 ℓ de água.

AMOSTRAGEM DOS VOLÁTEIS FLORAIS E ANÁLISES QUÍMICAS

Aromas florais foram coletados pelo método padrão de *headspace* dinâmico (Dötterl *et al.*, 2005b) para estabelecer o perfil dos odores emitido pelas flores de *H. martii* e *H. nymphoides* cultivadas no Jardim experimental, e determinar a volatilização dos perfumes adicionados em flores artificiais (veja abaixo). Flores naturais (n = 1 a 4 flores) e flores artificiais (n = 1, ensacada 10 min após a adição de uma substância) foram ensacadas em sacos de poliéster (Toppits Bratschlauch®, 10 cm x

10cm). Os voláteis foram adsorvidos em um tubo de vidro com 0,2 g de uma mistura 1:1 de Tenax-TA (Supelco) 60-80 e Carbotrap (Supelco) 20-40, ou 0,2 g de SuperQ (Supelco). O ar no interior do saco foi sugado durante 4 horas, através do tubo de adsorção, utilizando-se uma bomba de vácuo (G12/01EB, Thomas, Puchheim, Alemanha), com fluxo constante de 200 ml/min. Utilizou-se 100 µl de acetona (SupraSolv, Merck KGaA, Alemanha) e uma mistura 9:1 de hexano e acetona (SupraSolv, Merck KGaA, Alemanha) para eluir os voláteis aprisionadas nos tubos de Tenax-Carbotrap e nos tubos SuperQ, respectivamente. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até a análise no Departamento de Sistemática de Plantas da Universidade de Bayreuth, Alemanha.

Para identificar os compostos emitidos pelas flores naturais e artificiais, 1 µl do eluente foi analisada em um espectômetro de massa Varian Saturno 2000, acoplado a um cromatógrafo gasoso Varian 3800, equipado com um injetor 1079 (Varian Inc., Palo Alto, EUA). A coluna ZB-5 e as configurações da cromatografia são descritas em Dötterl *et al.* (2005b). A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massa obtidos com os presentes no banco de dados de espectros de massa NIST 08 ou MassFinder 3, e confirmada por comparação dos tempos de retenção com dados publicados (Adams, 2007). A identidade dos componentes individuais foi confirmada por comparação dos espectros de massa e tempo de retenção dos compostos na coluna bem como comparados a padrões autênticos sintéticos. Para a quantificação dos compostos, 1 µg de 3-cloro-4-metoxitolueno foi adicionado como padrão interno em amostras coletadas tanto a partir de flores naturais quanto das artificiais.

BIOENSAIOS COM COMPOSTOS SINTÉTICOS

Montamos flores artificiais simulacros das de *Hydrocleys* com fita adesiva inodora, comumente utilizada para capturar insetos pragas em casas de vegetação, de cores amarela ou azul (BioTrap®, Biocontrol, São Paulo, Brasil). Para simular estaminódios, fixamos aglomerados de pequenas tiras de papel de seda amarelo ou azul ao ápice de uma vara de madeira, envolta por um cone de fita adesiva (Fig.1). Através da vara, os modelos de flores de *Hydrocleys* foram presos a um retângulo de isopor de 25 x 10 cm. Apenas a face superior da flor artificial foi adesiva. As flores artificiais tiveram o mesmo diâmetro de flores naturais de *H. martii* (28-30 mm).

Foram realizados experimentos de dupla escolha, utilizando-se duas flores artificiais: uma impregnada com o odor a ser testado no ensaio e uma flor sem cheiro (controle). Em cada teste, duas flores artificiais foram fixadas em um retângulo de isopor (25x10 cm), instalado na área central do alagado, próximo à manchas de flores de *H. martii* (≈60-150 flores por m²) e cerca de um

metro de distância um do outro. As flores artificiais foram inspecionadas a cada 30 a 50 min e as abelhas aderidas à superfície adesiva foram transferidas para frascos mortíferos com acetato de etila. Após a inspeção, as unidades amostrais foram reposicionadas pelo menos 1,5 m distante do ponto de amostragem anterior. A cada transferência de local o isopor era rotacionado de forma que as flores artificiais ficassem opostas à posição anterior. Os experimentos começaram às 9:00 e terminaram às 13:00hrs. Realizamos os bioensaios em dias ensolarados, entre 25 a 27 de julho e 12 a 15 de agosto de 2010. Apenas fêmeas foram contadas.

Nos biotestes utilizou-se compostos sintéticos padrão (*standards*) de *p*-methylanisole ($\geq 99\%$), 2-methoxy-4-methylphenol ($\geq 98\%$), 3,4-dimethoxytoluene ($\geq 97\%$), 3,4,5-trimetoxitolueno ($\geq 97\%$) e methyl salicilate ($\geq 99\%$), Sigma-Aldrich, Alemenha. Aplicou-se 1 μl de um composto puro nos estaminódios dos modelos azuis e amarelos e testadas contra um controle negativo (uma flor artificial inodora). As unidades amostrais foram instaladas na superfície da lagoa 10min após a adição das substâncias com pipetadeira automática de ponta descartável.

As quantidades dos compostos liberados pelas flores artificiais durante os bioensaios foram determinadas pela mesma técnica de headspace dinâmico e técnicas de GC-MS. A quantidade de cada composto liberado por flor artificial em relação à sua abundância em flores naturais é mostrada na tabela 1.

ANÁLISE DOS DADOS

Para testar as diferenças no total de abelhas capturadas em flores artificiais nos tratamentos pareados, para cada composto utilizado, o teste binomial exato foi realizado assumindo a hipótese nula de que a proporção de indivíduos capturados seria a mesma em flores artificiais impregnadas com odor e flores artificiais controle de mesma coloração. Para comparar as proporções de abelhas capturadas nas flores artificiais das duas cores, usamos tabela de contingência qui-quadrado 2x2. Para comparar a diferença entre o número total de abelhas capturadas em flores tratamento amarelas vs flores tratamento azuis foi utilizado qui-quadrado para proporções esperadas desiguais, assumindo-se que o número de abelhas capturadas nas duas cores é o mesmo. Esse teste foi realizado dessa maneira, já que o número de exposições de flores artificiais das duas cores não foi igual (72 flores artificiais azuis e 107 artificiais amarelas).

Para abordar as diferenças qualitativas e quantitativas na composição do perfume entre as espécies, foi realizada análise de similaridade (ANOSIM), utilizando uma matriz de quantidade relativa (índice de similaridade de Bray-Curtis) e matriz de presença e ausência (índice de

Sorensen). Utilizou-se o software Primer6, para testar as hipóteses de que a quantidade relativa ou a presença do composto é a mesma nas duas espécies.

RESULTADOS

AROMAS FLORAIS

As flores de ambas as espécies *Hydrocleys* emitiram uma quantidade similar absoluta de odores, dominados por compostos aromáticos e vários terpenóides (Tab. 2). As flores de *H. martii* produziram 22 compostos, e as de *H. nymphoides* 13. No entanto, alguns compostos são exclusivos para flores de uma ou outra espécie, e cada espécie teve seu perfil característico de compostos (ANOSIM: $R = 0,98$, $p < 0,001$). A quantidade relativa de compostos emitidos por cada uma das espécies também foi diferente (ANOSIM: $R = 1,00$, $p < 0,001$). Em ambas as espécies benzenóides metoxilados foram os componentes dominantes do perfume floral, correspondendo a cerca de 88% em *H. martii* e 91% em *H. nymphoides*. *p*-methylanisole e 3, 4-dimethoxytoluene foram os compostos mais abundantes nas flores de *H. martii* (80,7%) e de *H. nymphoides* (65,5%), respectivamente.

BIOTESTES

Nos testes de dupla escolha, flores artificiais amarelas e azuis impregnadas com *p*-methylanisole atraíram significativamente mais abelhas de *P. palpalis* do que flores controle. Apenas algumas poucas abelhas foram coletadas nas flores artificiais impregnadas com os outros compostos abundantes encontrados em flores *Hydrocleys* (2-Methoxy-4-methylphenol, 3,4-dimethoxytoluene, e 3,4,5-trimethoxytoluene). As flores artificiais impregnadas com methyl salicilate, que ocorre em pequena quantidade nas flores das duas espécies (Tabela 2) não atraem qualquer abelha (Fig. 2).

A proporção de abelhas atraídas às flores tratamento *versus* controle não diferiu entre as duas cores (tabelas de contingência 2x2, $X^2 = 1,74$, $df = 1,0$, $p = 0,18$), mas o número total de abelhas capturadas em experimentos com flores amarelas (73 abelhas fêmeas) foi maior do que o esperado pelo acaso, indicando que as flores amarelas foram mais atraentes do que as flores azuis (16 abelhas fêmeas) ($X^2 = 22,51$; $gl = 1$; $p = 0,0001$).

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que as flores de *Hydrocleys martii* e *H. nymphoides* produzem compostos voláteis em quantidades totais semelhantes, mas com diferentes composição e proporção

de voláteis. Dos cinco compostos aromáticos voláteis (benzenóides) encontrados nas flores, apenas *p*-methylanisole, mais abundante em *H. martii*, mas também presentes em quantidades inferiores nas flores de *H. nymphoides*, atraíram fêmeas de *P. palpalis*. Flores artificiais amarelas bem como azuis impregnados com *p*-methylanisole atraíram as abelhas oligoléticas. Estes resultados mostram que este composto volátil é o guia principal para fêmeas de *P. palpalis* no encontro de suas plantas hospedeiras. Os dados apontam, entretanto, que a cor amarela também seria útil na busca por parceiros interespecíficos nessa interação.

Esta é a primeira análise dos aromas florais de representantes de Alismataceae e revelou que espécies de *Hydrocleys* apresentam benzenóides metoxilados, raros em buquês de florais e de função biológica desconhecida: 3,4,5-trimethoxytoluene (sinônimo 1,2,3-trimethoxy-5-methylbenzene) foi encontrada apenas em *Narcissus* (Amaryllidaceae) e 3,4-dimethoxytoluene (1,2-dimethoxy-4-methylbenzene) em Malvaceae, Orchidaceae e Valerianaceae (El-Sayed 2011). 2-Methoxy-4-methylphenol (*p*-creosol) é mais comum, e foi encontrado em algumas Amaryllidaceae, Araceae, Asteraceae, Oleaceae e Orchidaceae (El-Sayed 2011) e se mostrou com propriedades repelentes para moscas tsé-tsé (*Glossina*, Diptera, Glossinidae) (Saini e Hassanali 2007).

O composto floral principal de *H. martii*, *p*-methylanisole (1-methoxy-4-methylbenzene), responsável pela atração da única espécie de polinizador, foi encontrada em baixas quantidades, em buquês florais de diversas espécies de plantas (Knudsen *et al.*, 2006). Recentemente, esse composto foi relatado em duas espécies de famílias não-relacionadas: a partir de sicônios de *Ficus semicirdata* (Moraceae) na China (Chen *et al.*, 2009) e em flores de *Cymbopetalum brasiliense* (Annonaceae) na Floresta Atlântica do Brasil (Braun *et al.*, 2011). Em ambos os casos *p*-methylanisole representou mais de 90% da produção total do aroma floral. Enquanto a função deste composto na associação Annonaceae-besouro não foi estudado ainda, na interação entre os figos e as vespas dos figos Chen *et al.* (2009) demonstraram que *p*-methylanisole funciona como atrativo apenas para a especializada vespa polinizadora *Ceratosolen graveyi* Grandi 1916 (Chalcidoidea, Agaonidae). Nessa interação esse composto é produzido em grandes quantidades, ocorre somente nessa espécie de *Ficus* na China e é liberado exatamente no momento da maturação das inflorescências não atraindo nenhuma outra espécie de vespa. Portanto esses autores consideraram como um canal privado de comunicação nessa interação especializada (Chen *et al.*, 2009; Soler *et al.*, 2010). Na associação entre abelhas oligoléticas de *P. palpalis*/*H. martii* na Caatinga, a intensa produção desse mesmo composto quando as flores das plantas abrem nos alagados temporários, orientam as abelhas polinizadoras oligolética a esses canteiros de flores.

As abelhas de uma espécie cogenérica, *Protodiscelis alismatis* (Ducke, 1908), oligolética em espécies de *Echinodorus* (Alismataceae) (Carvalho & Schlindwein não publicado) e que eram comuns nos locais de estudo, não foram atraídas pelos compostos utilizados nesses experimentos. Essa observação aponta para a especificidade desse canal de comunicação química. A mistura de odores produzidos pelas flores *Echinodorus palaefolius* não contém qualquer uma das principais substâncias produzidas por flores *Hydrocleys* (Carvalho, Dötterl, Schlindwein, não publicado).

Há apenas informações esparsas sobre a atração olfativa de abelhas oligolética às suas plantas hospedeiras. Fêmeas de *Andrena vaga* Panzer 1799, oligoléticas em flores de *Salix* (Salicaceae), foram atraídas por 1,4-dimethoxybenzene, o composto volátil predominante de suas plantas hospedeiras, somente no início da temporada de voo (Dötterl *et al.*, 2005a) em uma área restrita do Jardim Botânico da Universidade de Bayreuth, Alemanha. Para a abelha coletora de óleo *Macrops fulvipes* (Fabricius 1804) (Melittidae), que também é oligolética nas flores de óleo de *Lysimachia* (Primulaceae) (Vogel, 1986; Westrich, 1989) experimentos em gaiolas mostraram que pistas olfativas complexas são atraentes para as fêmeas naivas, mas combinado ao sinal visual a resposta foi maior (Dötterl *et al.*, 2011). Após tornarem-se experientes as fêmeas diminuíram a atratividade a cada estímulo apresentado individualmente. Em experimentos também em gaiolas abelhas naivas de *Chelostoma rapunculi* (Lepelletier 1841) responderam as pistas florais visuais e olfativa de suas plantas hospedeiras de *Campanula*, entretanto a capacidade de atração as pistas olfativas mudam quando as abelhas tornam-se experientes, respondendo frequentemente somente ao estímulo visual (Milet-Pinheiro *et al.*, 2012). Os nossos resultados, obtidos no ambiente natural, mostram que um único composto volátil atraiu fêmeas de *P. palpalis* e que este é o mais importante canal de comunicação com as flores nestes ambientes confinados. Não podemos afirmar com certeza, entretanto, que *p*-methylanisole mostra a mesma capacidade de atração para fêmeas naivas de *P. palpalis*, pois os ninhos destas pequenas abelhas e provavelmente nidificantes no solo não são conhecidos e, portanto, os indivíduos emergidos recentemente não estavam disponíveis ou, quando presente, não se distinguem de experientes. Nossos dados apontam que abelhas experientes são atraídas, uma vez que para caírem na flor artificial, tiveram que voar entre várias flores naturais de *H. martii*. Algumas das abelhas capturadas inclusive apresentavam grãos de pólen nas escopas.

Como a concentração dos compostos 2-Methoxy-4-methylphenol, 3,4-dimethoxytoluene, e 3,4,5-trimethoxytoluene artificialmente adicionadas as flores não foram próximas das concentrações naturalmente encontradas nas flores (Tab. 1), não podemos afirmar que eles também não são importantes atrativos à *P. palpalis*. É conhecido que determinados compostos podem funcionar como atraentes em determinadas concentrações enquanto que em outras funcionam como repelentes

(Schiestl *et al.*, 2011). Esse fato, entretanto, não invalida a importância de p-methylanisole como canal de comunicação entre *Hydrocleys* e *P. palpalis*, já que em concentrações próximas das naturais, essa substância foi atrativa para as abelhas que tiveram o comportamento de visitar uma flor sem nenhum outro recurso.

Este é o primeiro estudo sobre atração química mediada por odores florais de uma espécie oligolética às suas plantas hospedeiras na região Neotropical e a primeira de um representante de uma espécie de Neopasiphaeinae, que tem distribuição restrita ao hemisfério sul. Devido a oligoetia ter surgido várias vezes de forma independente (Sipes & Wolf 2001; Sipes & Tepedino 2005; Larkin *et al.*, 2008) os mecanismos de reconhecimento e descoberta das plantas hospedeiras pelas abelhas também evoluiu de forma independente nas diferentes linhagens e, possivelmente, são mediadas por diferentes tipos de sinais. No entanto, nosso estudo reforça os achados recentes (Dobson & Bergström 2000; Dötterl *et al.*, 2005a), que os compostos voláteis específicos do buquê de flores são cruciais para a localização do hospedeiro de plantas em abelhas oligoléticas.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos a Antônio de Brito Tenório e Leniro Tenório Vaz pelo apoio no trabalho de campo. A Irmigard Schäffler e Paulo Milet-Pinheiro pela ajuda no trabalho de laboratório. Esse trabalho foi desenvolvido com recursos do CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) e Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Brasil. Licença de coleta ICMBio N° 12737-1.

REFERENCIAS

Adams RP. 2007. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.

Almeida EAB, Pie MR, Brady SG, Danforth BN. 2012. Biogeography and diversification of colletid bees (Hymenoptera: Colletidae): emerging patterns from the southern end of the world. *Journal of Biogeography* **39**: 526–544.

Andrade-Lima D. 1981. The caatingas dominium. *Revista Brasileira de Botânica* **4**: 149-163.

APGIII (The Angiosperm Phylogeny Group). 2009. An update of the Angiosperm Phylogenetic Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 105-121.

- Braun M, Dötterl S, Gottsberger G. 2011.** Absence of pollinators and apomictic fruit production in an Atlantic rainforest population of *Cymbopetalum brasiliense* (Annonaceae). *Plant Systematics and Evolution* **296**: 265-273.
- Burger H, Dötterl S, Ayasse M. 2010.** Host-plant finding and recognition by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee. *Functional Ecology* **24**: 1234-1240.
- Cane JH, Sipes S. 2006.** Characterizing Floral Specialization by Bees: Analytical Methods e Revised Lexicon for Oligolecty. In: Waser NM, Ollerton J. eds. *Plan-Pollination Interactions: From specialization to Generalization*. The University of Chicago Press: Chicago, 99-121.
- Carvalho AT, Schlindwein C. 2011.** Obligate association of an oligolectic bee and a seasonal aquatic herb in semi-arid north-eastern Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society* **102**: 355–368.
- Carvalho AT, Maia ACD, Ojima PY, Santos AA, Schlindwein C. 2012.** Nocturnal bees are attracted by widespread floral scents. *Journal of Chemical Ecology* **38**: 315-318.
- Chen C, Song QS, Proffit M, Bessiere JM, Li ZB, Hossaert-McKey M. 2009.** Private channel: a single unusual compound assures specific pollinator attraction in *Ficus semicordata*. *Functional Ecology* **23**:941-50.
- Chittka L, Raine NE. 2006.** Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 428-435
- Dobson H, 2006.** Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator. In: Dudareva N, Pichersky E. eds. *Biology of Floral Scent*. CRC Press/Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, 147–198.
- Dobson HEM, Bergström G. 2000.** The ecology and evolution of pollen odors. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 63–87.
- Dobson HEM. 1987.** Role of flower and pollen aromas in host plant recognition by solitary bees. *Oecologia* **72**: 618-623.
- Dötterl S, Füssel U, Jürgens A, Aas G. 2005a.** 1,4 dimethoxybenzene, a floral scent compound in willows that attracts an oligolectic bee. *Journal of Chemical Ecology* **31**: 2993-2998.

- Dötterl S, Jürgens A. 2005b.** Spatial fragrance patterns in flowers of *Silene latifolia*: Lilac compounds as olfactory nectar guides? *Plant Systematics and Evolution* **255**: 99-109.
- Dötterl S, Milchreit K, Schäffler I. 2011.** Behavioural plasticity and sex differences in host finding of a specialized bee species. *Journal of Comparative Physiology A Sensory Neural and Behavioral Physiology* **197**: 1119–1126.
- Dötterl S, Vereecken NJ. 2010.** The chemical ecology and evolution of bee–flower interactions: a review and perspectives. *Canadian Journal of Zoology*. **88**: 668–697.
- Dressler RL. 1982.** Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**: 373–394.
- El-Sayed AM 2011.** The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. Acessível em <<http://www.pherobase.com>>
- Haynes RR, Holm-Nielsen LB. 1992.** The Limnocharitaceae. *Flora Neotropica Monographs New York Botanical. Garden. New York* **56**: 1-32.
- Knudsen JT, Eriksson R, Gershenzon J, Ståhl, B. 2006.** Diversity and Distribution of Floral Scent. *The Botanical Review* **72**: 1–120.
- Larkin LL, Neff JL, Simpson BB. 2008.** The evolution of a pollen diet: Host choice and diet breadth of *Andrena* bees (Hymenoptera: Andrenidae). *Apidologie* **39**: 133-145.
- Michener CD. 2007.** *The bees of the world*. London: The Johns Hopkins University Press.
- Milet-Pinheiro P, Ayasse M, Schlindwein C, Dobson HEM, Dötterl S. 2012.** Host location by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee: innate and learned behavior. *Behavioral Ecology* doi:10.1093/beheco/arr219.
- Prado D. 2003.** As caatingas da América do Sul. In: Leal I.R., Tabarelli M. Silva J.M.C. eds. *Ecologia e conservação da Caatinga* 3-73. Editora Universitária: Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
- Raguso RA. 2003.** Olfactory landscapes and deceptive pollination: signal, noise and convergent evolution in floral scent. In: Blomquist GJ, Vogt RG, eds. *Insect pheromone biochemistry and molecular biology. The biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles*. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Academic Press, 631–650.

- Raguso RA. 2008.** Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Annual Review of ecology and Systematics* **39**: 549–569.
- Robertson C. 1925.** Heterotropic bees. *Ecology* **6**: 412-436.
- Roubik DW, Hanson PE. 2004.** *Orchid bees of tropical America: biology and field guide*. Spanish/English edition. InBIO Press (Editorial INBio), Heredia, Costa Rica. 370 p.
- Saini RK., Hassanali A. 2007.** 4-Alkyl-substituted analogue of guaiacol shows greater repellency to Savannah tsetse (*Glossina* spp.)” (2007). Rajinder K.Saini and Ahmed Hassanali. *Journal of Chemical Ecology* **33**: 985-99.
- Schiestl FP, Ayasse M, Paulus HF, Löfstedt C, Hansson BS, Ibarra F, Francke W. 1999.** Orchid pollination by sexual swindle. *Nature* **399**: 421–422.
- Schiestl FP, Huber, FK, Gomez JM. 2011.** Phenotypic selection on floral scent: trade-off between attraction and deterrence? *Evolutionary Ecology* **25**: 237-248.
- Schlindwein C, Wittmann D. 1997a.** Stamen movements in flowers of *Opuntia* (Cactaceae) favour oligolectic pollinators. *Plant Systematics and Evolution* **204**: 179–193.
- Schlindwein C, Wittmann D. 1997b .** Micro-foraging routes of *Bicolletes pampeana* (Colletidae) and bee-induced pollen presentation in *Cajophora arechavaletae* (Loasaceae). *Botanica Acta* **110**: 177–183.
- Schlindwein C. 1998.** Frequent oligolecty characterizing a diverse bee-plant community in a xerophytic bushland of subtropical Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* **33**: 46-59.
- Schlindwein C. 2004.** Are oligolectic bees always the most effective pollinators? In: Freitas BM, Pereira JOP, eds. *Solitary bees. Conservation, rearing and management for pollination*. Fortaleza: Imprensa Universitária, 231-240.
- Sipes SD, Tepedino VJ. 2005.** Pollen-host specificity and evolutionary pat-terns of host switching in a clade of specialist bees (Apoidea: Diadasiina). *Biological Journal of the Linnean Society* **86**: 487–505.

Soler C, Magali P, Chun C, Hossaert-McKey M. 2010. Private channels in plant-pollinator mutualisms. *Plant Signaling & Behavior* **5**:7, 1-3.

Svensson GP, Okamoto T, Kawakita A, Goto R, Kato M. 2010. Chemical ecology of obligate pollination mutualisms: testing the ‘privatechannel’ hypothesis in the *Breynia–Epicephala* association. *New Phytologist* **186**: 995–1004

Tabarelli M, Aguiar Neto AV, Grillo, AAS, Santos, AMM. 2007. Fragmentation and habitat loss in the Atlantic forest north of the São Francisco River. In: Siqueira Filho JA, Leme EMC Org. *Fragments of the Atlantic forest of Northeast Brazil: biodiversity, conservation and the bromeliads*. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdiop. 80-99.

Vogel, S. 1986. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. Zweite Folge. *Lysimachia* und *Macropis*. *Tropische und subtropische Pflanzenwelt* **54**: 147-312.

Westrich P. 1989. *Die Wildbienen Baden-Württembergs*. Spezieller Teil. Ulmer, Stuttgart.

Com duas Tabelas

Tabela 1: Número de flores naturais de *Hydrocleys martii* e *H. nymphoides* equivalentes à quantidade de compostos emitidos por flores artificiais por composto testado (n=5).

	p-Methylanisole	2-Methoxy-4-Methylphenol	3,4-Dimethoxytoluene	3,4,5-Trimethoxytoluene
<i>H. martii</i>	74	0	20.684	91.300
<i>H. nymphoides</i>	344	2.091	530	30.214

Tabela 2: Quantidade total de e percentual médio (% $\pm$ EP) dos compostos do perfume floral, coletados por meio de métodos *headspace* dinâmico em flores de *H. martii* e *H. nymphoides*.

	<i>H. martii</i>	<i>H. nymphoides</i>
	n=10	n=8
Amount of floral scent per flower [μ g/h]	0.21 $\pm$ 0.08 (n=4)	0.26 $\pm$ 0.03 (n=4)
<i>Benzenoids and phenylpropanoids</i>		
p-Methylanisole* ¹	80.73 $\pm$ 2.45	7.12 $\pm$ 1.65
Methyl benzoate*	0.21 $\pm$ 0.10	1.62 $\pm$ 0.75
2-Methoxy-4-methylphenol* ²	-	11.12 $\pm$ 4.25
Methyl salicylate* ³	0.01 $\pm$ 0.01	0.62 $\pm$ 0.32
3,4-Dimethoxytoluene* ⁴	2.68 $\pm$ 0.69	67.5 $\pm$ 6.65
2,4-Dimethoxytoluene	5.04 $\pm$ 0.65	-
3,4,5-Trimethoxytoluene* ⁵	0.01 $\pm$ 0.01	2.37 $\pm$ 1.87
3,4-Dimethoxybenzaldehyde	-	0.25 $\pm$ 0.25
Elemicin	-	0.25 $\pm$ 0.16
<i>N-bearing compounds</i>		
Benzeneacetonitrile*	0.44 $\pm$ 0.18	Tr
Indole*	-	Tr
<i>Terpenoids</i>		
α -Pinene*	3.02 $\pm$ 1.77	Tr
β -Myrcene*	0.30 $\pm$ 0.21	1.75 $\pm$ 1.27
(<i>E</i>)- β -Ocimene*	0.97 $\pm$ 0.38	-

Linalool*	0.18±0.10	-
(Z)-Ocimene oxide	0.25±0.10	-
(E)-Ocimene oxide	2.29±0.71	-
(E)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatriene*	0.24±0.15	0.42±0.42
Sesquiterpenes		
β-Bourbonene + other sesquiterpene	0.79±0.22	-
β-Caryophyllene*	0.57±0.17	-
unknown, m/z: 161,105,91,119,133,79	0.03±0.02	-
γ-Muurolene	0.19±0.06	-
α-Muurolene	1.38±0.36	0.76±0.76
unknown, m/z: 119,161,91,105,79,39	0.05±0.05	1.08±1.08
δ-Cadinene	0.04±0.04	5.13±1.13
(E)-Nerolidol*	0.47±0.2	-

* Identification based on authentic standards.

¹⁻⁵ Numbers indicate compounds tested in bioassays with artificial flowers.

Com duas figuras

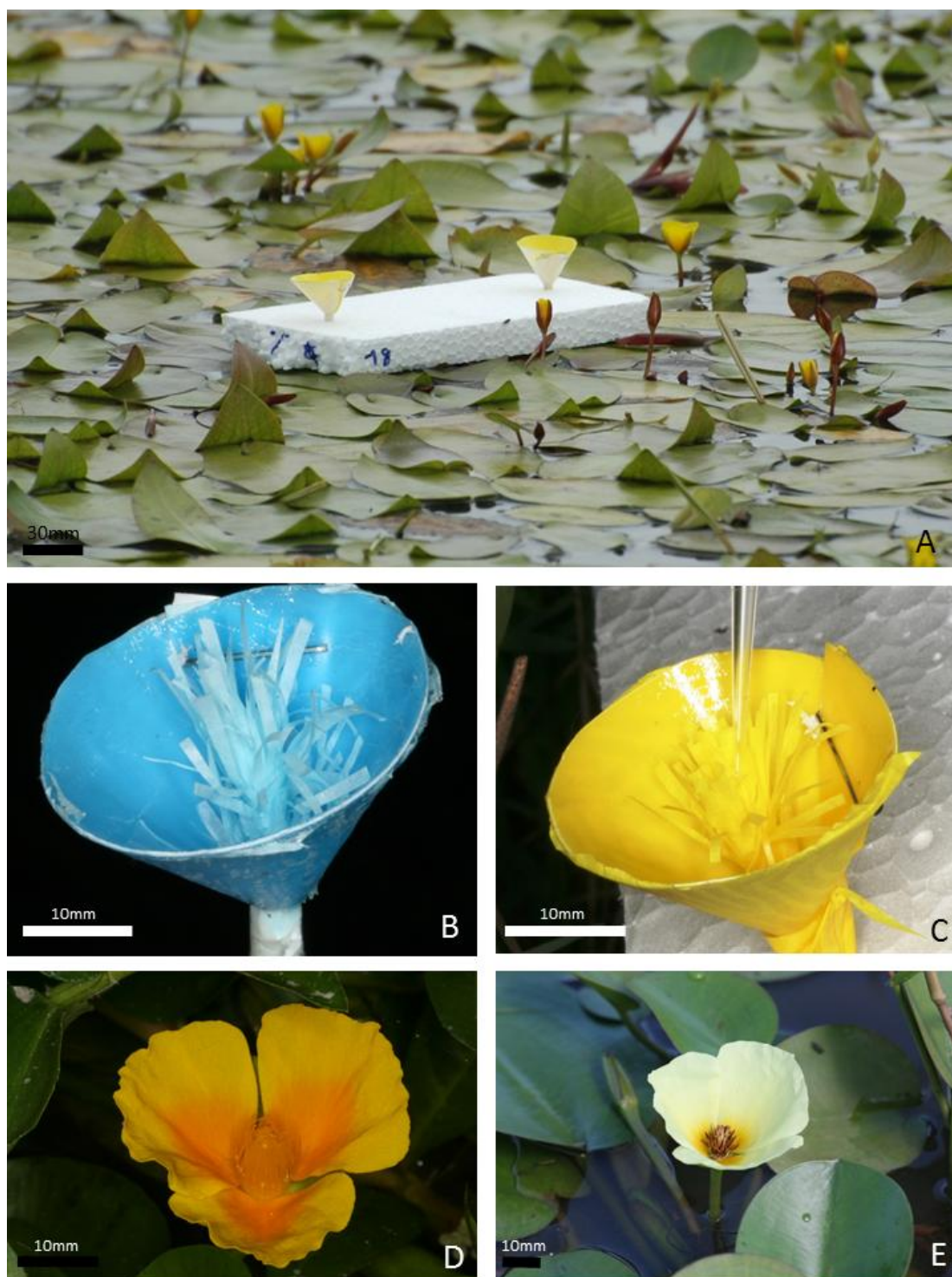


Figura 1: Par de flores artificiais fixadas ao isopor (250mm X 10mm), como apresentado nos biotestes. B e C- Flores artificiais. D e E- Flores naturais de *Hydrocleys martii* e de *H. nymphoides*

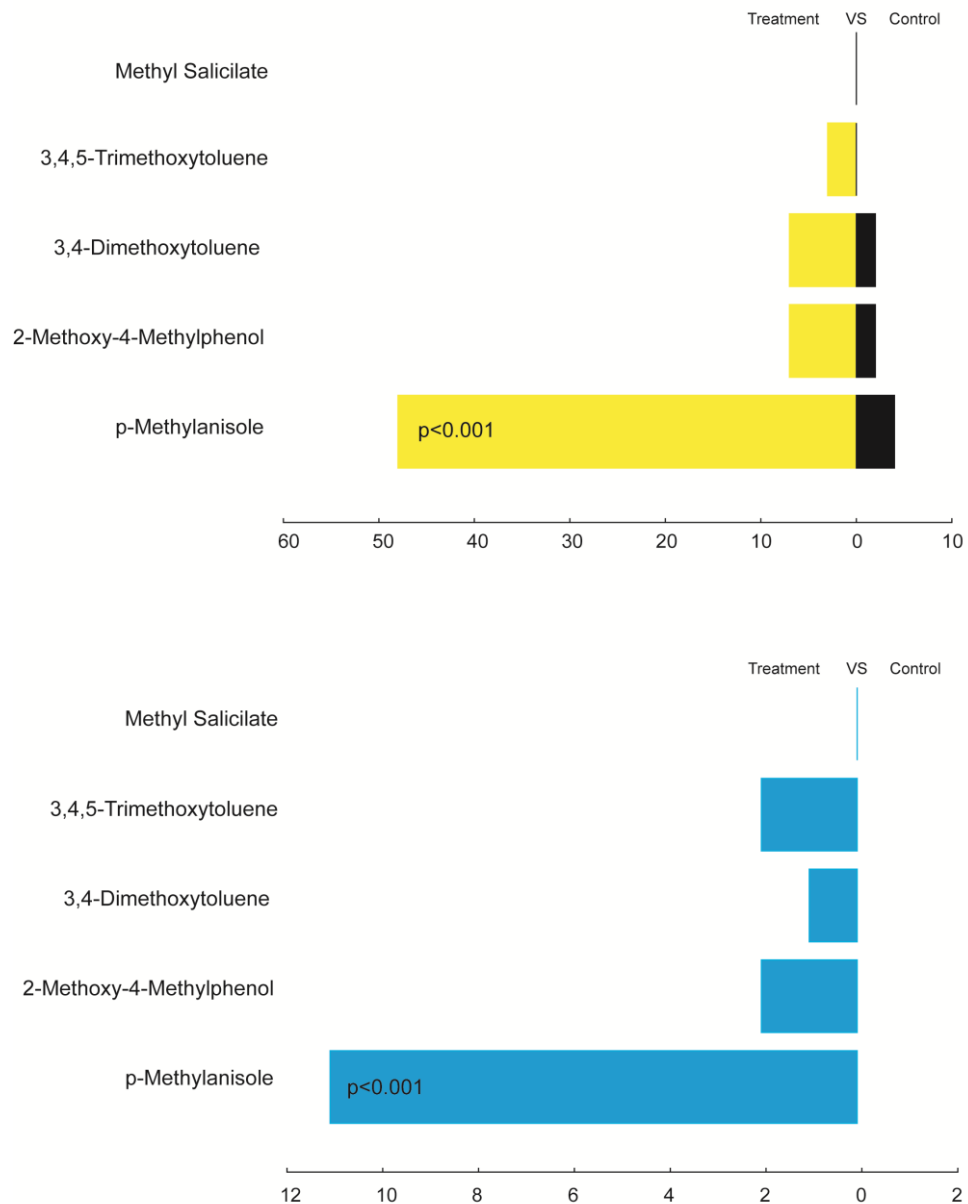


Figura2: Número de fêmeas de *Protodiscelis palpalis* capturadas em flores artificiais de cor amarela (em cima) e azul (abaixo). As diferenças de atratividade entre o tratamento e controle foram acessadas pelo teste binomial exato. Foram expostas 72 flores artificiais azuis e 107 amarelas.

5.4 Manuscrito

Tradução livre do artigo publicado no *Journal of Chemical Ecology* em língua inglesa

(J Chem Ecol 38: 315-318 DOI 10.1007/s10886-012-0084-z)

ABELHAS NOTURNAS SÃO ATRAÍDAS POR ODORES FLORAIS COMUNS

AIRTON TORRES CARVALHO^{1,2}, ARTUR CAMPOS DALIA MAIA³, POLIANA YUMI OJIMA², ADAUTO

A. DOS SANTOS¹, CLEMENS SCHLINDWEIN^{2*}

¹ *Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Universidade Federal da*

Paraíba, Cidade Universitária, 58059-900 João Pessoa, PB, Brazil

² *Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627,*

Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

³ *Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Luis*

Freire, s/n, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

Autor correspondente: Clemens Schlindwein, schlindw@gmail.com

Com duas figuras

Resumo

A localização de flores na escuridão é uma tarefa desafiadora para polinizadores noturnos. Aromas florais frequentemente desempenham um papel crucial orientando-os aos seus hospedeiros. Utilizando compostos voláteis comumente encontrados em buquês florais, capturamos abelhas noturnas fêmeas de *Megalocta* (Halictidae). Assim, desvendamos pistas olfativas envolvidas na busca por recursos florais. Aplicando esse novo método de amostragem, oferecemos novas perspectivas sobre a investigação em abelhas noturnas.

Palavras-chave

Augochlorini, relação abelha- planta, Benzenoides, Brasil, Halictidae, *Megalocta*, sinônimos
pistas olfativas

INTRODUÇÃO

Fragrâncias florais são importantes sinais e atrativos de polinizadores noturnos (Knudsen and Tollsten 1995; Raguso 2001, 2008; Dobson 2006). Pistas odoríferas são cruciais para muitas abelhas, tanto na localização de flores a longa distância (e.g. machos de abelhas das orquídeas, Apidae, Euglossini; Dressler 1982) como no reconhecimento de flores a curta distância (revisado por Dötterl and Vereecken 2010).

No entanto, devido à escassez de estudos voltados especificamente para o papel de voláteis em interações abelha-planta, excluindo as abelhas das orquídeas entre as espécies de Apidae, Andrenidae e Colletidae, não mais que dez espécies estão associadas à atração por odores específicos (Burger et al. 2010; Dötterl and Vereecken 2010; Dötterl et al. 2011). Isso também é verdadeiro para sistemas de polinização envolvendo as poucas espécies de abelhas ativas a noite.

O forrageamento noturno de abelhas tem sido observado entre Colletidae (gênero *Ptiloglossa*) e Halictidae (*Lasioglossum*, *Megommation*, *Megaloptidia*, *Reepenia* e *Megalopta*) nos Neotrópicos, Apidae (*Xylocopa*) nos Paleotrópicos e Andrenidae (*Perdita*) na região Neártica (Wcislo et al. 2004; Michener 2007). O gênero *Megalopta* Smith, 1853 (27 spp.) (Augochlorini) se distribui do centro do México ao norte da Argentina (Michener 2007). No Brasil, abelhas de *Megalopta* são encontradas em quase todas as formações florestais, desde regiões secas à florestas tropicais chuvosas (Silveira et al., 2002). Voando e coletando recursos florais em condições de baixa luminosidade e até mesmo na completa escuridão, essas abelhas ocupam um nicho inacessível a outros grupos de abelhas (Warrant et al. 2004; Wcislo et al. 2004). Devido aos seus hábitos noturnos/crepusculares, poucos exemplares de abelhas de *Megalopta* estão representados em coleções entomológicas e sua biologia é quase desconhecida, com exceção *M. genalis* (e.g. Warrant et al. 2004; Wcislo and Tierney 2009).

Alguns estudos envolvendo abelhas de *Megalopta* se referem ao forte odor emitido pelas flores das quais essas abelhas visitam (e. g. Wolda and Roubik 1986; Bullock et al. 1987;

Hopkins et al. 2000). Entretanto, ainda é desconhecido o eventual papel dos odores como pistas florais na atratividade para abelhas noturnas. Compostos voláteis florais comumente encontrados em buquês florais de plantas com antese noturna e reconhecidos como atrativos para machos de abelhas das orquídeas foram selecionados para este estudo. Assim, perguntou-se: esses odores florais também atraem abelhas noturnas?

MATERIAIS E MÉTODOS

Conduzimos experimentos de atratividade de abelhas à odores florais em duas localidades: a primeira localizada entre os municípios de Alto Araguaia, no Estado do Mato Grosso, e Santa Rita do Araguaia, no Estado de Goiás (17°18' S, 53°12' W), caracterizada por vegetação de Cerrado, um complexo savânico comum à região central do Brasil. A segunda está localizada no Nordeste do Brasil (Município de Camaragibe) (8°02'S 34°59'W) e corresponde a uma área moderadamente urbanizada com fragmentos de Floresta Atlântica, floresta tropical chuvosa que ocorre ao longo da costa Atlântica do Brasil.

Foram confeccionadas armadilhas com garrafas tipo PET transparentes de dois litros, adaptadas a partir do modelo usado para capturar machos de euglossine. Cada unidade consistia de uma garrafa com dois orifícios opostos (22 mm Ø) na porção mediana. Em cada orifício, foi inserido um funil construído com a parte superior de outras garrafas. As iscas de cheiro foram confeccionadas com bolas de papel filtro impregnada com 5 ml do volátil floral a ser testado, posteriormente dependuradas por um fio de barbante dentro das garrafas entre os orifícios. (Fig.1). *Standards* comerciais de sete compostos voláteis florais foram utilizados: methyl salicylate (Sigma-Aldrich, Brazil ≥99.0%), β-ionone (Sigma-Aldrich, Germany >97%), 1,8-cineole (Merck, Germany >98%), vanillin (Sigma-Aldrich, Germany >97%), benzyl acetate, (Merck, Germany >95%), eugenol (Merck, Germany >98%) e benzyl benzoate (Fluka Buchs, Switzerland >99%). Conjuntos de oito armadilhas, sete contendo cada uma isca de cheiro e uma sem odor (controle), foram instalados dentro de um raio de 10 m no interior de fragmentos de mata. As armadilhas foram instaladas as 17:30 h e retiradas as 06:00 h da

manhã seguinte. Na área de Cerrado, 11 pontos foram amostrados entre 21 de fevereiro e 4 de março de 2010. Na área de Floresta Atlântica, amostragens foram conduzidas durante três noites entre 19 de março e 3 de Julho de 2010. Todos os espécimes amostrados nas duas localidades foram agrupados para aplicação do teste binomial exato, utilizado para saber a diferença na frequência de abelhas capturadas em cada armadilha de cheiro comparado com o controle. Foi testada a hipótese nula de que o número de abelhas seria igual tanto nos tratamentos como no controle. Os espécimes coletados foram depositados na Coleção entomológica da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, e Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, Brasil.

RESULTADOS

Trinta e quatro abelhas fêmeas de três espécies de *Megalopta* foram capturadas nas armadilhas de cheiro: *Megalopta* sp. aff. *aegis* na Floresta Atlântica, *M. guimaraesi* Santos & Silveira, 2009 no Cerrado, e *M. amoena* (Spinola, 1853) nas duas localidades. As abelhas foram atraídas por quatro dos sete compostos testados: os benzenóides benzyl acetate, methyl salicylate, e benzyl benzoate, bem como no o terpeno irregular β -ionone. Diferenças entre o número de abelhas capturadas nas armadilhas tratamento *versus* controle somente foram encontradas somente para benzenóides, cada um atraindo entre nove e 14 indivíduos (Fig. 2a). Somente uma abelha foi coletada em β -ionone e nenhuma registrada para 1,8-cineole, vanillin ou eugenol, bem como nenhuma nas armadilhas controles. Fêmeas de *M. guimaraesi* e *M. amoena* foram capturadas nos três benzenóides testados e de *Megalopta* aff. *aegis* somente à benzyl benzoate e methyl salicylate (Fig. 2b). No Cerrado, foi capturado um total de 21 abelhas, atraídas mais eficientemente por benzyl acetate e methyl salicylate. Na Floresta Atlântica, benzyl benzoate e methyl salicylate foram mais atrativos para abelhas de *Megalopta* onde foi coletado um total de 13 indivíduos.

DISCUSSÃO

Neste estudo mostra que abelhas ativas à noite do gênero *Megalopta* foram atraídas por

voláteis florais comumente encontrados em buquês florais (veja Knudsen et al. 2006). Devido às armadilhas serem iguais e construídas com garrafas PET transparentes, pode ser descartada a eventual influência do estímulo visual (e.g. cor, formato) para esses insetos. Dessa forma, concluímos que essas abelhas noturnas são capazes de se guiar até as suas potenciais plantas hospedeiras apenas com o auxílio de pistas olfativas. Com isso permite ser adicionado um novo grupo de insetos à lista dos polinizadores noturnos guiados principalmente pelos odores, que já incluíam morcegos, mariposas e besouros (Gottsberger and Silberbauer-Gottsberger 1991; Knudsen and Tollsten 1995; Bernhardt 2000; Raguso 2001). Os compostos atrativos às fêmeas de *Megalopta* são proeminentes constituintes de buquês florais de várias angiospermas polinizadas por polinizadores ativos durante à noite (Raguso 2001; Dobson, 2006; Knudsen et al. 2006). As espécies quiropterófila de *Ochroma* (Malvaceae) e *Gustavia* (Lecythidaceae), que apresentam, por exemplo, em seus buquês odores que incluem methyl salicylate, benzyl acetate, benzyl benzoate e β -ionone (Knudsen and Tollsten 1995; Knudsen and Mori 1996, Knudsen et al. 2006), são também frequentemente visitadas por espécies de *Megalopta* (Wcislo et al. 2004). Todos esses compostos também são eliciadores de comportamento de coleta em machos de euglossine (Dressler 1982).

Até esse momento, é muito cedo especular sobre os detalhes da atratividade seletiva aos odores por fêmeas de *Megalopta*. Incluir uma grande variedade de odores em amostragens maiores poderia ser um próximo passo interessante. Além disso, detalhes da biologia da polinização de plantas visitadas por *Megalopta* e outras abelhas noturnas e a caracterização dos odores de suas flores são necessárias para desvendar outras facetas dessa interação.

Nossos resultados indicam que abelhas noturnas, similarmente a outros grupos de polinizadores noturnos, usam fortemente o sinal odorífero na busca por flores na escuridão. Especulamos que abelhas noturnas têm usado sinais químicos comuns a plantas com antese noturna para acessar recursos pouco explorados por outros grupos de polinizadores noturnos.

Nossos achados fornecem um novo método de amostragem de abelhas *Megalopta* e abrem um novo campo de investigação nas interações entre abelhas noturnas e suas plantas recurso, bem como seu comportamento, biologia e distribuição. Esperamos que o uso desses compostos voláteis possam também induzir respostas atrativas de outros grupos de abelhas noturnas.

Agradecimentos

Agradecemos a Stefan Dötterl e aos dois revisores anônimos pelas sugestões e comentários críticos que incrementaram o manuscrito. Leandro Santos pela identificação de parte das abelhas coletadas nesse estudo, Ricardo Camargo pela ajuda no campo, ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) pelas permissões de coleta. Esse estudo recebeu fundos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- BERNHARDT, P. 2000. Convergent evolution and adaptive radiation of beetle-pollinated angiosperms. *Plant. Syst. Evol.* 222:293–320.
- BULLOCK, S. H., AYALA, R., BAKER, I., and BAKER, H. G. 1987. Reproductive biology of the tree *Ipomoea wolcottiana* (Convolvulaceae). *Madrono*. 34:304–314.
- BURGER, H., DÖTTERL, S., and AYASSE, M. 2010. Host plant finding and recognition by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee. *Funct. Ecol.* 24:1234–1240.
- DOBSON, H. E. M. 2006. Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator, pp. 147-198, in N. Dudareva and E. Pichersky (eds.). *Biology of floral scent*. CRC Press, Boca Raton.
- DÖTTERL, S. and VEREECKEN, N. J. 2010. The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: a review and perspectives. *Can. J. Zool.* 88:668-697.
- DÖTTERL, S., MILCHREIT, K., and SCHÄFFLER, I. 2011. Behavioural plasticity and sex differences in host finding of a specialized bee species. *J. Comp. Physiol. A* 197:1119-1126.
- DRESSLER, R. L. 1982. Biology of the orchid bees (Euglossini). *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13:373-394.

- GOTTSBERGER, G. and SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. 1991. Olfactory and visual attraction of *Erioscelis emarginata* (Cyclocephalini, Dynastinae) to the inflorescences of *Philodendron selloum* (Araceae). *Biotropica* 23:23-28.
- HOPKINS, M. J. G., FORTUNE HOPKINS, H. C., and SOTHERS, C. A. 2000. Nocturnal pollination of *Parkia velutina* by *Megalopta* bees in Amazonia and its possible significance in the evolution of chiropterophily. *J. Trop. Ecol.* 16:733-746.
- KNUDSEN, J. T., ERIKSSON, R., GERSHENZON, J., and STÅHL, B. 2006. Diversity and distribution of floral scent. *Bot. Rev.* 72:1-120.
- KNUDSEN, J. T. and TOLLSTEN, L. 1995. Floral scent in bat-pollinated plants: a case of convergent evolution. *Bot. J. Linn. Soc.* 119:45-57.
- KNUDSEN, J. T. and MORI, S. A. 1996. Floral scents and pollination in neotropical Lecythidaceae. *Biotropica*. 28:42-60
- MICHENER, C. D. 2007. The bees of the world (2nd Edition). The Johns Hopkins University Press, London.
- RAGUSO, R. A. 2001. Floral scent, olfaction, and scent-driven foraging behavior, pp. 83-105, in L. Chittka, and J. D. Thomson (eds.). *Cognitive Ecology of Pollination*. University Press, Cambridge.
- RAGUSO, R. A. 2008. Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 39:549-569.
- SILVEIRA, F. A., MELO, G. A., and ALMEIDA, E. A. B. 2002. Abelhas Brasileiras, Sistemática e Identificação. Fernando Silveira, Belo Horizonte.
- WARRANT, E. J., KELBER, A., GISLE'N, A., GREINER, B., RIBI, W., and WCISLO, W. T. 2004. Nocturnal vision and landmark orientation in a tropical halictid bee. *Curr. Biol.* 14:1309-1318.
- WCISLO, W. T., ARNESON, L., ROESCH, K., GONZALEZ, V., SMITH, A., and FERNANDEZ, H. 2004. The evolution of nocturnal behaviour in sweat bees, *Megalopta genalis* and *M. ecuadoria* (Hymenoptera, Halictidae): an escape from competitors and enemies? *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 83:377-387.
- WCISLO W. T. and TIERNEY, S. M. 2009. Behavioural environments and niche construction: the evolution of dim-light foraging in bees. *Bio. Rev.* 84:19-37.
- WOLDA, H. and ROUBIK, D. W. 1986. Nocturnal bee abundance and seasonal bee activity in a Panamanian forest. *Ecology* 67:426-433.

Figuras

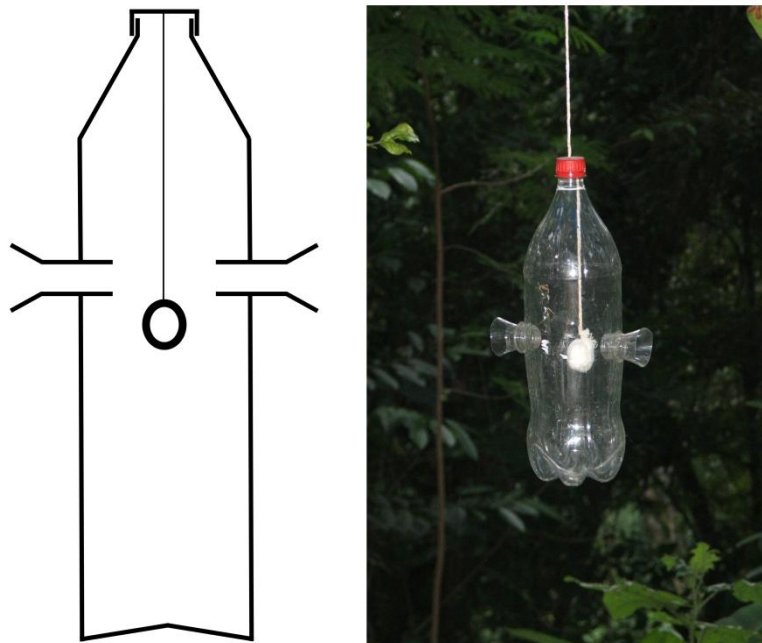


Figura 1: Armadilhas de cheiro utilizadas na captura de abelhas de *Megalopta*, esquema e fotografia. As armadilhas foram construídas de garrafas tipo PET de dois litros com duas entradas e a isca de cheiro localizada entre as aberturas.

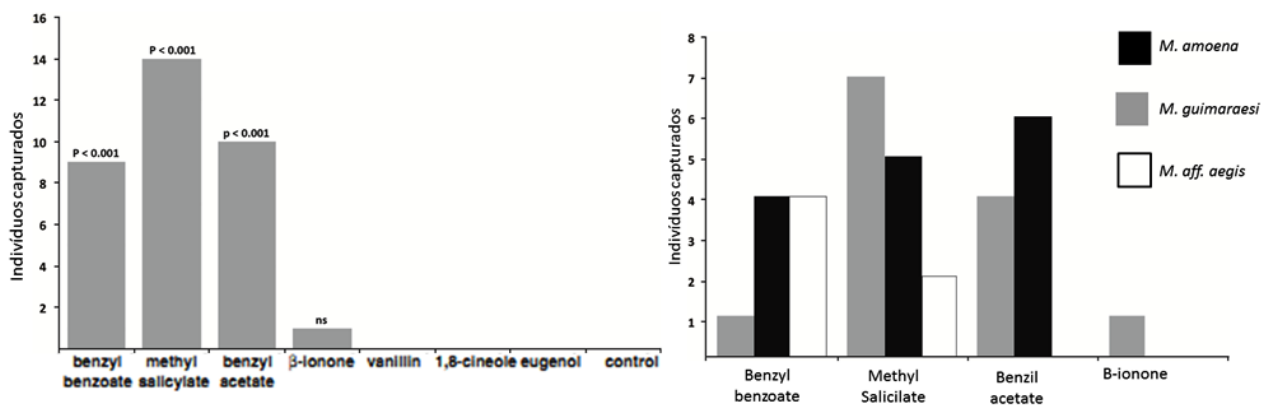


Figura 2: Número de fêmeas de *Megalopta* capturadas em armadilhas com *standards* de voláteis florais em duas localidades no Brasil. A) Número de abelhas capturadas por composto volátil. Benzyl benzoate, methyl salicylate, benzyl acetate atraíram significativamente mais abelhas que controle, acessado pelo teste binomial exato. B) Número de indivíduos por espécie de *Megalopta* capturadas por composto; ns: não significante.