

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**ABELHAS OLIGOLÉTICAS E PLANTAS HOSPEDEIRAS: ECOLOGIA  
COGNITIVA E DA POLINIZAÇÃO**

PAULO MILET-PINHEIRO

RECIFE

2011

PAULO MILET-PINHEIRO

**ABELHAS OLIGOLÉTICAS E PLANTAS HOSPEDEIRAS: ECOLOGIA  
COGNITIVA E DA POLINIZAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Clemens Schindwein  
Co-orientador: Dr. Manfred Ayasse  
Área de Concentração: Ecologia Vegetal  
Linha de pesquisa: Ecologia da polinização

RECIFE

2011

**Milet-Pinheiro, Paulo**

**Abelhas oligoléticas e plantas hospedeiras: ecologia cognitiva e da polinização/ Paulo Milet-Pinheiro. – Recife: O Autor, 2011.**

**111 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Clemens Schindwein**

**Coorientador: Manfred Ayasse**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia Vegetal, 2011.**

**Inclui bibliografia**

- 1. Abelha- pólen 2. Plantas hospedeiras 3. Polinização I. Título.**

**571.8642**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2011-228**

PAULO MILET PINHEIRO

“ABELHAS OLIGOLÉTICAS E PLANTAS  
HOSPEDEIRAS: ECOLOGIA COGNITIVA E  
DA POLINIZAÇÃO”,

BANCA EXAMINADORA:

---

Dr. Clemens Peter Schlindwein (Orientador) – UFPE

---

Dra. Vera Lucia Imperatriz Fonseca - USP

---

Dr. Leandro Freitas – Jardim Botânico - RJ

---

Dra. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro - UFPE

---

Dra. Reísla Silva de Oliveira - UFOP

Recife- PE  
2011

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador Clemens Schlindwein que acompanhou todas as etapas de minha formação profissional desde a iniciação científica e que contribuiu, em muito, para o grande amor e fixação que tenho pela biologia.

Ao meu co-orientador Manfred Ayasse pela oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa em Ulm, Alemanha, onde dei meus primeiros passos na bonita e encantadora ecologia química.

A Stefan Dötterl pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa em Bayreuth, Alemanha, e por toda paciência em me ensinar minuciosamente os métodos da ecologia química.

A Heidi Dobson pela leitura crítica que contribuiu tanto no aspecto científico, quanto no aspecto linguístico dos artigos.

A todos os membros do Laboratório Plebeia, especialmente a Airton Torres Carvalho, Carlos Eduardo Pinto e Reislá Oliveira pela amizade e contribuições inestimáveis.

A Hannah Burger, Universidade de Ulm, e Irmgard Schäffler, Universidade de Bayreuth, pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa na Alemanha.

Aos membros da banca pela disponibilidade e dedicação na correção desta tese.

A Antônio Tenório por fornecer o suporte logístico no campo para a realização de parte deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFPE e a todos os seus funcionários.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante as atividades de pesquisa no Brasil.

Ao DAAD pela bolsa concedida durante o estágio sanduíche na Universidade de Ulm.

À CAPES pela concessão das passagens aéreas Brasil-Alemanha.

A toda minha família, especialmente aos meus pais, Luciano e Vera, e meu irmão pelo grande amor, carinho, atenção, apoio e dedicação que me permitiram e ajudaram a concluir mais uma etapa da vida.

A Marina Barreto pelo amor, carinho e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

## Resumo

O presente estudo investigou a interação entre abelhas oligoléticas, que coletam pólen em plantas de um mesmo gênero ou família, e suas plantas hospedeiras, destacando aspectos adaptativos da ecologia cognitiva e da polinização. Abelhas oligoléticas *Chelostoma rapunculi* apresentam adaptações neurológicas visuais e olfativas que controlam a atração e preferência inata pelos sinais florais da planta hospedeira *Campanula trachelium*. Baseada nessas adaptações *Ch. rapunculi* é capaz de reconhecer flores de *Ca. trachelium*, caracterizadas por sinais visuais repetitivos na natureza, i.e. cor UV-azul, mas, ao mesmo tempo, por sinais olfativos altamente específicos, as espiroacetais. Esses voláteis florais raros são os únicos capazes de atrair abelhas inexperientes de *Ch. rapunculi* e são, conseqüentemente, a chave para o reconhecimento inato da planta hospedeira *Ca. trachelium*. Isso indica que, pelo menos nessa espécie, a oligoetia deve ser controlada por limitações neurológicas, geneticamente determinadas. Na interação entre a abelha oligolética *Ceblurgus longipalpis* e a planta hospedeira *Cordia leucocephala*, foi evidenciada uma dependência mútua, onde a planta distílica depende da abelha como único polinizador e a abelha depende da planta como fonte exclusiva de pólen (monoetia). Nessa associação, adaptações morfológicas em ambos os parceiros foram evidenciadas. A abelha *Ce. Longipalpis* desenvolveu peças bucais alongadas e pilosas incomuns entre abelhas de línguas curtas para explorar o pólen escondido de flores longistilas de *Co. leucocephala* e o néctar na base do tubo floral estreito, ambos inacessíveis para outros visitantes florais.

**Palavras-chave:** Abelhas oligoléticas, adaptações, *Campanula*, *Chelostoma*, *Ceblurgus*, *Cordia*, cognição, comportamento de forrageio, plantas hospedeiras, polinização, sinais visuais e olfativos.

## Abstract

We investigated the association between oligolectic bees, which collect pollen from plants of a given genus or family, and their host plants, emphasizing evolutionary aspects of the cognitive and pollination ecology. Oligolectic *Chelostoma rapunculi* bees are provided by neurological adaptations (visual and olfactory) that control the innate attraction and preference for floral cues of the host plant *Campanula trachelium*. Based on these adaptations, *Ch. rapunculi* are able to recognise flowers of *Ca. trachelium*, which are characterised, on the one hand, by visual cues redundant in the nature, i.e. bee UV-blue colour, but, on the second hand, by highly specific olfactory cues, the spiroacetals. These rare floral volatiles are the only attracting foraging-naïve bees of *Ch. rapunculi* and, thus, are the key for innate host-recognition of *Ca. trachelium*. This indicates that oligolecty, at least in *Ch. rapunculi*, is controlled by neurological constraints, genetically based. In the association between oligolectes of *Ceblurgus longipalpis* and host plants of *Cordia leucocephala*, we found a mutual reproductive dependence, where the distilic plant depend on this bee to be pollinated and the bee depend on the plant as exclusive pollen source (monolecty). Morphological adaptations were registered in both partners: the bee evolved prolonged mouthparts rare among short-tongued bees that enable them to access the hidden pollen from flowers with short-level anthers and nectar at the base of the flower tube, inaccessible for other unspecialised flower visitors.

**Key-words:** adaptations, *Campanula*, *Chelostoma*, *Ceblurgus*, *Cordia*, cognition, foraging behaviour, host plants, pollination, visual and olfactory cues.

## Sumário

Agradecimentos .....	IV
Resumo .....	V
Abstract .....	VI
Apresentação.....	1
<b>1. Fundamentação teórica.....</b>	<b>2</b>
1.1. Oligoetia: breve histórico e definição .....	2
1.2. Abelhas oligoléticas e o reconhecimento de plantas hospedeiras .....	3
1.3. Abelhas oligoléticas: adaptações e implicações ecológicas.....	6
1.4. Plantas hospedeiras e a relação com polinizadores oligoléticos .....	8
1.5. A interação entre <i>Cordia leucocephala</i> e <i>Cebalurgus longipalpis</i> .....	10
1.6. Literatura citada.....	11
<b>2. Atração inata da abelha oligolética <i>Chelostoma rapunculi</i> por sinal visual e olfativo de sua planta hospedeira <i>Campanula trachelium</i>.....</b>	<b>21</b>
2.1. Resumo.....	22
2.2. Introdução.....	23
2.3. Material e Métodos .....	24
2.3.1. Espécies estudadas .....	24
2.3.2. Gaiola experimental.....	25
2.3.3. Experimentos comportamentais .....	26
2.3.4. Testes estatísticos .....	27
2.4. Resultados .....	28
2.4.1. Experimentos comportamentais .....	28
2.5. Discussão.....	31
2.6. Agradecimentos .....	34
2.7. Literatura citada.....	34
<b>3. Reconhecimento inato de plantas hospedeiras por uma abelha oligolética.....</b>	<b>39</b>
3.1. Resumo.....	40
3.2. Introdução.....	41
3.3. Material e Métodos .....	42
3.3.1. A abelha .....	42
3.3.2. As plantas.....	42
3.3.3. A gaiola experimental.....	43

3.3.4. Experimentos comportamentais .....	44
3.3.5. Análise de reflectância e hexágono de cores .....	45
3.3.6. Análises estatísticas .....	45
3.4. Resultados .....	46
3.4.1. Experimentos comportamentais .....	46
3.4.2. Análise de reflectância e hexágono de cores .....	47
3.5. Discussão.....	49
3.5.1. Preferência inata de forrageio de <i>Chelostoma rapunculi</i> .....	49
3.5.2. Sinais visuais e olfativos de flores de <i>Campanula trachelium</i> , <i>Echium vulgare</i> e <i>Potentilla recta</i> .....	51
3.5.3. A gaiola experimental e o estudo de respostas inatas e adquiridas.....	52
3.6. Agradecimentos .....	53
3.7. Literatura citada.....	53
<b>4. Espiroacetais: a chave para o reconhecimento de plantas hospedeiras por uma abelha oligolética</b> .....	61
4.1. Resumo.....	62
4.2. Introdução.....	63
4.3. Material e métodos .....	65
4.3.1. Amostra de voláteis florais .....	65
4.3.2. Eletrofisiologia.....	66
4.3.3. Análises químicas.....	66
4.3.4. Preparação de misturas sintéticas.....	67
4.3.5. Experimentos comportamentais .....	68
4.3.6. Análises estatísticas .....	70
4.4. Resultados .....	70
4.4.1. Voláteis florais .....	70
4.4.2. Eletrofisiologia.....	72
4.4.3. Experimentos comportamentais .....	73
4.5. Discussão.....	75
4.5.1. Voláteis florais de <i>Campanula trachelium</i> .....	76
4.5.2. Reconhecimento inato de <i>Campanula trachelium</i> por <i>Chelostoma rapunculi</i> .....	76
4.5.3. Mudança no padrão inato de forrageio de <i>Chelostoma rapunculi</i> .....	78
4.6. Agradecimentos .....	79
4.7. Literatura citada.....	79

<b>5. A dependência reprodutiva mútua entre a planta distílica <i>Cordia leucocephala</i> (Cordiaceae) e a abelha oligolética <i>Ceblurgus longipalpis</i> (Halictidae, Rophitinae) na Caatinga</b> .....	84
5.1. Resumo.....	85
5.2. Introdução.....	86
5.3. Material e Métodos .....	87
5.3.1. Local de estudo .....	87
5.3.2. Espécie estudada .....	87
5.3.3. Morfologia floral e antese.....	88
5.3.4. Sistema reprodutivo.....	88
5.3.5. Visitantes florais e polinizadores efetivos .....	89
5.3.6. Análises estatísticas .....	90
5.4. Resultados .....	90
5.4.1. Morfologia floral e antese.....	90
5.4.2. Sistema reprodutivo.....	93
5.4.3. Visitantes florais e polinizadores efetivos .....	93
5.4.4. Fluxo polínico .....	97
5.5. Discussão.....	100
5.5.1. Dependência reprodutiva mútua entre <i>Cordia leucocephala</i> e <i>Ceblurgus longipalpis</i> .....	100
5.5.2. Fluxo polínico .....	103
5.6. Agradecimentos .....	104
5.7. Literatura citada.....	105
<b>6. Conclusões e perspectivas futuras</b> .....	111

## **Apresentação**

O presente estudo é resultado de quatro anos e meio de doutorado, cujo trabalho de campo foi desenvolvido parte no Brasil (Pedra, Pernambuco) e parte na Alemanha (Ulm e Bayreuth). Durante esse período, foram pesquisados aspectos da ecologia cognitiva e da polinização em sistemas de polinização especializados entre abelhas oligoléticas e suas plantas hospedeiras.

A tese de doutorado está dividida em seis capítulos. O primeiro deles, a fundamentação teórica, abrange o atual conhecimento científico envolvendo a ecologia cognitiva e da polinização na associação entre abelhas oligoléticas e plantas hospedeiras, bem como as problemáticas a serem investigadas. Os capítulos 2, 3, 4 e 5 foram elaborados em forma de artigo a serem enviados a periódicos científicos internacionais. As citações e referências bibliográficas seguem as normas das revistas às quais cada artigo será submetido.

O segundo capítulo, “Atração inata da abelha oligolética *Chelostoma rapunculi* por sinal visual e olfativo de sua planta hospedeira *Campanula trachelium*”, teve por objetivo verificar a atração de abelhas recém-emergidas e experientes de *Ch. rapunculi* por sinais florais (visual e olfativo) de sua planta hospedeira *Ca. trachelium*. O artigo será submetido à revista *Arthropod-Plant Interactions*.

O terceiro capítulo, “Reconhecimento inato de plantas hospedeiras por uma abelha oligolética” teve por objetivo verificar se existe uma preferência de abelhas recém-emergidas de *Ch. rapunculi* por sinais florais (visual e olfativo) da planta hospedeira *Ca. trachelium*. O artigo será submetido à revista *Biological Journal of the Linnean Society*.

No quarto capítulo, “Espiroacetais: a chave para o reconhecimento de plantas hospedeiras por uma abelha oligolética”, identificam-se quais voláteis florais abelhas inexperientes e experientes de *Ch. rapunculi* utilizam para reconhecer sua planta hospedeira *Ca. trachelium*. O artigo será submetido à revista *Functional Ecology*.

O quinto capítulo, “A dependência reprodutiva mútua entre a planta distílica *Cordia leucocephala* (Cordiaceae) e a abelha oligolética *Ceblurgus longipalpis* (Halictidae, Rophitinae) na Caatinga”, descreve a ecologia da polinização de *Co. leucocephala*, enfatizando aspectos específicos da interação com seu polinizador oligolético *Ce. longipalpis*. Esse último manuscrito foi publicado na revista *Annals of Botany*.

Por fim, o último capítulo apresenta uma conclusão geral dos temas investigados e as perspectivas futuras que surgiram durante a execução desta tese.

## **1. Fundamentação teórica**

### **1.1. Oligoetia: breve histórico e definição**

A associação entre as angiospermas e seus polinizadores é caracterizada por uma troca de interesses, onde as plantas oferecem recompensas florais aos animais e recebem em troca o “serviço” da polinização. As angiospermas representam atualmente um número estimado de 250.000 espécies (Heywood, 1993), das quais mais de 90% são polinizadas por animais, principalmente insetos (Buchmann e Nabhan, 1996). Entre os insetos, as abelhas são os principais polinizadores de angiospermas e visitam as flores em busca, principalmente, de energia (néctar) e alimento para suas larvas, essencialmente pólen e néctar (Michener, 1974; Roubik, 1989).

De uma forma geral, estudos de comunidades de abelhas e plantas melíferas revelam uma grande diferença no número de interações entre determinados grupos de abelhas e espécies vegetais associadas, o que hoje em dia tem sido frequentemente evidenciado por estudos de redes de interações entre plantas e seus polinizadores (Vásquez e Aizen, 2003; 2006; Jordano *et al.*, 2006; Bascompte e Jordano, 2007). Loew (1884; 1886) foi o primeiro a descrever que, enquanto algumas abelhas coletavam recurso floral em diversas plantas, outras espécies restringiam a coleta de recurso a plantas de um mesmo grupo ou até mesmo de uma única espécie, classificando-as, respectivamente, como abelhas politróficas, oligotróficas e monotróficas. No entanto, nessa classificação, Loew (1884; 1886) não diferenciava o recurso floral (e.g. néctar ou pólen) coletado pelas abelhas, o que foi observado posteriormente por Lovell (1912; 1913; 1914). Tendo em vista que abelhas podem coletar néctar em variadas fontes, mas ainda assim restringir a coleta de pólen a poucas plantas, Robertson (1925) utilizou uma nova terminologia, categorizando as abelhas em três grupos, de acordo com o espectro de plantas que elas visitavam para coletar pólen: 1) Monoléticas - coleta de pólen em uma única planta; 2) Oligoléticas - coleta de pólen em espécies vegetais relacionadas e 3) Poliléticas - coleta de pólen em espécies de diferentes táxons.

Com o acúmulo de conhecimento gerado por novos estudos de comunidade de abelhas e plantas melíferas e o desenvolvimento de técnicas mais apuradas para medir especialização (e.g. caracterização de cargas polínicas das células de crias), diferentes padrões de interações surgiram, evidenciando níveis de especializações intermediários àqueles anteriormente definidos (veja, por exemplo, Michener, 1954; 1979; Moldenke, 1975). Diante desse novo cenário e de uma terminologia problemática, Cane & Sipes (2006) reavaliaram as interações e

definiram seis níveis de especialização em abelhas: 1) Abelhas monoléticas – como definidas anteriormente por Robertson (1925); 2) Abelhas estreitamente oligoléticas - coleta de pólen em algumas espécies de plantas do mesmo clado de uma única família; 3) Abelhas ecleticamente oligoléticas - coleta de pólen em algumas espécies de poucos gêneros de plantas de diferentes famílias; 4) Abelhas mesoléticas - geralmente coletam pólen em muitas espécies de poucas famílias, ou em famílias muito grandes, em muitas espécies de uma tribo ou subfamília; 5) Abelhas poliléticas - coletam pólen em flores de várias famílias vegetais e 6) Amplamente poliléticas - coletam pólen em mais de 25% das espécies melitófilas disponíveis.

Em um contexto biológico, esses níveis de especialização devem estar relacionados às diferentes habilidades das abelhas em explorar um determinado tipo de pólen. Pólen é a principal fonte de alimento larval, mas sua composição protéica varia imensamente, o que deve ter conseqüências fisiológicas diretas para as abelhas especialistas (Roulston *et al.*, 2000; Roulston e Cane, 2002; Weiner *et al.*, 2010). Algumas evidências sugerem que abelhas oligoléticas são bem adaptadas para digerir o pólen de plantas hospedeiras, podendo absorver nutrientes mais eficientemente do que outras abelhas (Dobson e Peng, 1997; Praz *et al.*, 2008a). No entanto, a adaptação a um determinado tipo de pólen deve levar, ao mesmo tempo, a uma menor capacidade na digestão de outros tipos polínicos (Weiner *et al.*, 2010). De fato, abelhas oligoléticas, criadas experimentalmente em fontes alternativas de pólen, não se desenvolvem ou apresentam um crescimento muito mais lento (Guirguis e Brindley, 1974; Praz *et al.*, 2008a). Isso quer dizer que, para garantir o provisão adequado de suas larvas, as abelhas oligoléticas precisam reconhecer suas plantas hospedeiras. O fato de que abelhas oligoléticas não coletam pólen em plantas alternativas, mesmo na ausência das hospedeiras (Strickler, 1979; Williams, 2003; Praz *et al.*, 2008b), sugere que o reconhecimento da fonte exclusiva de pólen é controlado por adaptações fisiológicas altamente específicas (e.g. visão e olfato) que devem “forçar” que as abelhas colem pólen apenas em plantas hospedeiras (Sedivy *et al.*, 2008).

## **1.2. Abelhas oligoléticas e o reconhecimento de plantas hospedeiras**

A pergunta, como abelhas especialistas encontram e reconhecem suas fontes exclusivas de pólen?, desperta grande interesse da comunidade científica. Linsley (1958) foi o primeiro a especular que abelhas oligoléticas recém-emergidas (inexperientes) seriam condicionadas aos voláteis de grãos de pólen, ainda no estágio larval, e os utilizariam para encontrar suas

fontes específicas de pólen. Embora alguns estudos demonstrem que abelhas oligoléticas inexperientes realmente usam odores do pólen para encontrar plantas hospedeiras (Dobson, 1987; Dobson e Bergström, 2000), é importante frisar que, até recentemente, faltavam evidências claras que corroborasse ou refutasse a teoria do condicionamento, sugerida por Linsley (1958). No entanto, em um estudo pioneiro, Praz *et al.* (2008b) mostraram que fêmeas inexperientes da abelha oligolética *Heriades truncorum* (Linnaeus, 1758) (Megachilidae) coletaram pólen exclusivamente nas suas plantas hospedeiras, mesmo que durante o estágio larval elas tivessem sido alimentadas experimentalmente em fontes alternativas de pólen. Diante disso, esses autores levantaram a hipótese de que as abelhas oligoléticas seriam providas de adaptações neurológicas geneticamente controladas, tais como receptores visuais e olfativos especializados, que seriam utilizados no reconhecimento das plantas hospedeiras e que essas adaptações altamente específicas restringiriam a capacidade das abelhas coletarem pólen em flores de plantas não hospedeiras e, conseqüentemente, de se tornarem generalistas (Praz *et al.*, 2008b; Sedivy *et al.*, 2008).

Para as abelhas oligoléticas, encontrar e reconhecer suas fontes de pólen é extremamente importante, principalmente porque suas larvas, em geral, não se desenvolvem eficientemente em pólen de plantas não hospedeiras (Guirguis e Brindley, 1974; Praz *et al.*, 2008a). Assim sendo, as flores das plantas hospedeiras devem ser providas de algumas características específicas que permitam que as abelhas as reconheçam. A percepção das flores por abelhas é muito complexa e envolve tanto aspectos visuais quanto olfativos (Lunau, 1995; Dobson e Bergström, 2000; Chittka e Raine, 2006). Sinais visuais, principalmente cor, são relativamente redundantes na natureza (Nilsson, 1983; Arnold *et al.*, 2009), ainda mais pelo fato de que as abelhas têm muita dificuldade em distinguir cores similares (Dyer e Chittka, 2004a; b; c). Em contrapartida, sinais olfativos apresentam uma grande variedade de voláteis, bem como de padrões de emissões de odores, o que pode ser utilizado por abelhas para discriminar diferentes espécies vegetais e, até mesmo, avaliar a disponibilidade de recursos (e.g. néctar e pólen) em diferentes flores (Dobson *et al.*, 1990; 1996; 1999; Bergström *et al.*, 1995; Dobson e Bergström, 2000; Howell e Alarcón, 2007). Devido a essa grande complexidade, acredita-se que os odores florais sejam a chave para o reconhecimento das plantas hospedeiras pelas abelhas oligoléticas (Dobson e Bergström, 2000; Dötterl e Vereecken, 2010)

Dobson (1987) mostrou pela primeira vez que abelhas oligoléticas utilizariam odores florais para discriminar plantas hospedeiras de não hospedeiras. Em estudo desenvolvido em

uma gaiola experimental, onde quatro espécies vegetais foram oferecidas simultaneamente, as abelhas inexperientes de *Colletes fulgidus longiplumosus* Stephen, 1954 (Colletidae) apresentaram uma clara preferência pelos odores florais de *Grindelia stricta* DC. (Asteraceae), sua principal fonte de pólen. Nesse estudo, entretanto, não foram investigados os compostos florais envolvidos no reconhecimento da planta hospedeira. Na verdade, a função de compostos florais no reconhecimento de plantas hospedeiras por abelhas oligoléticas foi estudada em apenas três sistemas. No primeiro deles, Dobson & Bergström (2000) encontraram que abelhas inexperientes de *Chelostoma florissomne* L. (Megachilidae) utilizariam protoanemonina, um composto floral raro, para reconhecer flores hospedeiras de *Ranunculus acris* L. (Ranunculaceae). Posteriormente, Dötterl *et al.* (2005), utilizando-se da técnica de cromatografia gasosa acoplada à detecção eletroantegráfica (GC-EAD), identificaram 16 compostos florais de duas espécies de *Salix* (Salicaceae), estimulando a antena da abelha oligolética *Andrena vaga* Panzer, 1799 (Andrenidae). Em bioensaios, cinco dessas substâncias, 1,4-dimethoxybenzeno, salicilato de metila, (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, e 2-feniletanol (individualmente ou misturadas), também estimularam respostas comportamentais nessa abelha (Dötterl *et al.*, 2005; Dötterl e Vereecken, 2010). Por fim, Andrews *et al.* (2007) mostraram que 1,2,4-trimethoxybenzeno e (*E*)-cinamaldeído, encontrados em flores de *Cucurbita moschata* Duchesne (Cucurbitaceae), seriam alguns dos compostos responsáveis pela atração da abelha especialista *Peponapis pruinosa* (Say, 1837) (Apidae).

O valor científico de cada um desses trabalhos em mostrar a função de voláteis florais na atração de abelhas oligoléticas é incontestável, mas uma análise criteriosa dos resultados revela que nenhum dos compostos florais encontrados pode ser a chave para o reconhecimento das plantas hospedeiras pelas abelhas oligoléticas. Por exemplo, protoanemonina, uma substância relativamente rara, foi encontrada, posteriormente, em outras espécies de Ranunculaceae não visitadas pela abelha oligolética *Ch. florissomne* (Jürgens e Dötterl, 2004). Os compostos florais responsáveis pela atração de *A. vaga* e *P. pruinosa* são encontrados em diversas espécies vegetais e não exclusivamente nas plantas hospedeiras (Knudsen *et al.*, 2006). Além do mais, alguns dos compostos florais comuns encontrados em *Salix caprea* L. e *S. atrocinerea* Brot. não foram encontrados em outras espécies co-genéricas também visitadas por *A. vaga* (Dötterl *et al.*, 2005; Dötterl e Vereecken, 2010). Os exatos meios que as abelhas oligoléticas utilizam para reconhecer suas fontes exclusivas de pólen continuam sendo, portanto, uma incógnita.

Sinais visuais também desempenham um papel importante na atração de abelhas oligoléticas e atuam sinergeticamente com sinais olfativos (Dötterl e Vereecken, 2010). Burger *et al.* (2010) mostraram que a abelha especialista *Hoplitis adunca* Panzer, 1758 (Megachilidae) apresenta uma preferência inata pela cor das flores da planta hospedeira *Echium vulgare* L. (Boraginaceae). Esses autores mostraram que flores artificiais azuis, simulando a cor das flores de *E. vulgare*, foram extremamente atrativas para as abelhas, o que não foi observado para flores artificiais amarelas. Além do mais, quando oferecidas juntamente com odores florais de *E. vulgare*, flores artificiais azuis foram mais atrativas, e estimularam mais pousos, do que flores artificiais azuis sem odores florais, o que novamente não foi observado em flores artificiais amarelas. Por fim, sinais olfativos isolados não atraíram abelhas efetivamente e uma combinação de ambos os sinais sempre foi mais efetiva, tanto em atrair quanto em estimular pousos de abelhas, do que cada um dos sinais isoladamente. Os autores concluíram, então, que os sinais florais atuam sinergeticamente e que a cor das flores seria o primeiro passo para o reconhecimento das plantas hospedeiras (atuando como um “filtro”), enquanto os odores florais seriam responsáveis pelo reconhecimento específico. A atuação sinérgica de sinais florais visuais e olfativos parece ser importante para abelhas especialistas em geral. Dobson e Bergström (2000), ao estudar quatro espécies de abelhas oligoléticas, mostraram que apenas a atuação conjunta de sinais visuais e olfativos de flores de plantas hospedeiras seria capaz de estimular respostas comportamentais, tais como pouso e extensão de probóscide. Em conjunto, essas descobertas mostram que as abelhas oligoléticas são capazes de utilizar diferentes sinais florais para encontrar e reconhecer suas plantas hospedeiras.

### **1.3. Abelhas oligoléticas: adaptações e implicações ecológicas**

A oligoetia é um fenômeno que acarreta uma série de implicações ecológicas e evolutivas (Wcislo e Cane, 1996). De uma forma geral, abelhas oligoléticas são providas de diversas adaptações morfológicas e comportamentais que permitem uma exploração mais eficiente dos recursos florais das plantas hospedeiras (Thorp, 1979; 2000), o que pode gerar uma vantagem competitiva contra os visitantes poliléticos (Strickler, 1979; Cane e Payne, 1988; Laverty e Plowright, 1988; Müller e Bansac, 2004).

*Perditomorpha pampeana* (Urban, 1995) (Colletidae), por exemplo, desenvolveu uma estratégia comportamental que lhe garante coletar o pólen antes que os seus competidores poliléticos. Essa espécie, ao penetrar na câmara nectarífera de *Cajophora arechavaletae*

Urban (Loasaceae), estimula a liberação de pólen através do movimento de um estame. Após alguns minutos, e respeitando uma rota de forrageamento, as abelhas voltam à flor inicial e coletam o pólen agora acessível. Subseqüentemente, as fêmeas continuam a sua rota e coletam mais pólen em outras flores já estimuladas (Schlindwein e Wittmann, 1997a). Em *Pavonia cancellata* Cav. (Malvaceae) foi observada uma interessante corrida contra o tempo entre a abelha oligolética *Ptilothrix plumata* Smith, 1853 (Apidae) e o besouro *Pristimerus calcaratus* (Boheman 1846) (Curculionidae). Esse curculionídeo, que se alimenta do pólen de *Pa. cancellata*, perfura e fecha as pétalas, indisponibilizando pólen para *Pt. plumata*. A abelha então, para garantir a alimentação de suas larvas, faz coletas de pólen breves e ininterruptas que se iniciam às 06:30 h e seguem até no máximo 09:30 h, quando cerca de 80 % das flores já foram fechadas pelos besouros (Schlindwein e Martins, 2000).

Morfologicamente, as abelhas especialistas também desenvolveram uma série de adaptações para explorar mais eficientemente o recurso de suas flores hospedeiras. O comprimento e ramificação dos pêlos das escopas, por exemplo, geralmente está associado ao tamanho dos grãos de pólen das plantas hospedeiras (Thorp, 1979; 2000). Na maioria das abelhas especializadas em pólen de Onagraceae, os pêlos das escopas são nitidamente mais longos, simples e espaçados do que aqueles das espécies irmãs não especializadas. Os grãos de pólen grandes e unidos por fios de vicina em Onagraceae formam massas densas que só podem ser transportadas por escopas com tais características (Linsley, 1958; Linsley *et al.*, 1963a; b; 1964; 1973).

Abelhas especializadas em plantas com flores tubulares apresentam frequentemente convergências adaptativas, como línguas alongadas para a coleta de néctar (Krenn *et al.*, 2005) e pêlos densos e ramificados nas peças bucais e nas pernas anteriores para a coleta de pólen nas anteras de difícil acesso (Thorp, 2000). As Rophitinae da América do Sul, oligoléticas em flores tubulares de *Argylia* (Bignoniaceae), *Exodeconus* (Solanaeae) e *Cordia* (Cordiaceae), desenvolveram línguas longas, o que as difere da maioria das outras Halictidae, uma família de abelhas com línguas tipicamente curtas (Rozen, 1997; Michener, 2007). A ocorrência de abelhas de língua longa em grupos caracteristicamente de língua curta já foi registrada em outras famílias, como Andrenidae e Colletidae, e, geralmente, está associada à coleta de néctar em flores tubulares, nas quais o acesso a esse recurso é inviabilizado para insetos de línguas curtas (Laroca e Almeida, 1985; Laroca *et al.*, 1989; Rozen e Ruz, 1995; Krenn *et al.*, 2005). Adicionalmente, algumas abelhas desenvolveram uma pilosidade atípica nas peças bucais, que desempenham um papel chave na exploração do pólen (Eickwort *et al.*,

1986; Müller, 1995; Alves-dos-Santos e Wittmann, 1999; Alves-dos-Santos, 2003; Krenn *et al.*, 2005). Tal pilosidade também é observada nas Rophitinae sul-americanas, mas a sua exata função para as abelhas não é conhecida (Rozen, 1997).

#### **1.4. Plantas hospedeiras e a relação com polinizadores oligoléticos**

As plantas hospedeiras, que se beneficiam por contar com polinizadores fiéis, também podem apresentar adaptações que favorecem a elas e a esse grupo de visitantes. As flores de *Campanula rapunculus* L. (Campanulaceae), por exemplo, possuem adaptações morfológicas e fisiológicas que garantem tanto uma liberação gradual do pólen, a partir da compartimentalização da corola, quanto uma abreviação das fases masculinas e femininas. Isso garante uma frequência de visitas permanentemente alta, garantindo um alto fluxo polínico. A alta taxa de formação de frutos em *Ca. rapunculus* (100%) mostra que o principal polinizador, a abelha oligolética *Chelostoma rapunculi* (Lepeletier, 1841) (Megachilidae), é extremamente eficiente (Schlindwein *et al.*, 2005). No caso das espécies *Opuntia brunneogemma* Ritter e *O. viridirubra* Ritter (Cactaceae), o movimento dos estames favorece a coleta de pólen pelos seus únicos polinizadores efetivos, as abelhas oligoléticas *Ptilothrix fructifera* Holmberg, 1903 (Apidae), *Lithurgus rufiventris* (Friese, 1908) (Megachilidae) e *Cephalocolletes rugata* Urban, 1995 (Colletidae), em detrimento dos mais de 30 visitantes. Durante a visita floral essas três espécies tocam nos filetes e estimulam o movimento dos estames em direção ao centro da flor. Finalizado o movimento, os grãos de pólen são apresentados em uma camada superior de fácil acesso e várias camadas inferiores, quase inacessíveis, que contêm 80% da carga polínica. Apenas fêmeas das três espécies de abelhas oligoléticas são capazes de coletar o pólen e néctar nessas camadas inferiores (Schlindwein e Wittmann, 1997b).

Embora a maior eficiência na coleta de pólen por parte das abelhas especialistas não acarrete necessariamente um maior sucesso de polinização para as plantas hospedeiras (Linsley *et al.*, 1963a; Barrows *et al.*, 1976; Grant e Hurd, 1979), estudos de polinização têm mostrado que abelhas oligoléticas são os principais polinizadores de espécies de *Opuntia*, *Parodia*, *Gymnocalycium*, *Pavonia*, *Ipomoea*, *Ludwigia*, *Petunia*, entre outros (Cruden, 1972; Schlindwein e Wittmann, 1995; 1997a; b; Pinheiro e Schlindwein, 1998; Schlindwein e Martins, 2000; Larsson, 2005; McIntosh, 2005). O caso da planta heterostífica *Eichornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae) é particularmente interessante por sua relação de dependência mútua com seu polinizador oligolético. *E. azurea* apresenta flores tubulares

compridas e estreitas e suas flores brevistilas dependem exclusivamente de *Ancyloscelis gigas* Friese, 1904 (Apidae, Emphorini) para serem polinizadas e, conseqüentemente, formar frutos. A abelha oligolética *A. gigas* coleta pólen apenas em flores de *E. azurea* para aprovisionar suas células de cria. Essa abelha desenvolveu peças bucais compridas com pêlos especializados, que permitem a coleta do pólen nas anteras mais basais das flores brevistila, o que outros visitantes florais não são capazes de fazer. Nessa relação estreita, a reprodução das abelhas e plantas é interdependente e a ausência do polinizador especializado pode levar à quebra de heterostilia na população (Alves-dos-Santos e Wittmann, 1999; 2000; Alves-dos-Santos, 2002; 2003).

Heterostilia é um polimorfismo floral controlado geneticamente e, geralmente, relacionado a um sistema de auto-incompatibilidade que previne auto-fecundação (Barrett, 1990; Gibbs, 1990). Flores distílicas apresentam a morfa brevistila (estiletos curtos e estames longos) e longistila (estiletos longos e estames curtos), que são relacionadas a uma auto-incompatibilidade entre morfais florais similares (Darwin, 1877; Vuilleumier, 1967; Ganders, 1979). Assim, o pólen de flores brevistilas é capaz de fecundar apenas flores longistilas e vice-versa. Caracteres adicionais, controlados por um supergene, estão geralmente associados a cada morfa floral como, por exemplo, morfologia do estigma e número, tamanho e ornamentação dos grãos de pólen (Ganders, 1979; Gibbs e Taroda, 1983; Shore e Barrett, 1985a; b; Barrett, 2002).

De acordo com Darwin (1877), a posição recíproca das anteras e estigmas em espécies distílicas leva a uma deposição de grãos de pólen de anteras dos dois níveis em posições distintas no corpo dos polinizadores efetivos. Isso aumentaria a polinização cruzada, uma vez que os polinizadores devem contatar os estigmas do nível correspondente com as partes do corpo, onde os grãos legítimos estariam aderidos. Conseqüentemente, o comportamento e a morfologia dos polinizadores são extremamente importantes para garantir um fluxo polínico adequado. Isso não significa, contudo, que apenas polinizadores especializados sejam capazes de efetuar a polinização de plantas heterostílicas. Na verdade, flores heterostílicas associadas a abelhas oligoléticas muitas vezes também são visitadas por outros insetos e não dependem necessariamente das abelhas especialistas para serem polinizadas (Ganders, 1979; Barrett, 1978; Schlindwein e Medeiros, 2006; Penante, 2008). Em *Turnera subulata* Smith e *T. hermanioides* Cambess. (Turneraceae), por exemplo, que apresentam flores distílicas em forma de disco, a formação de frutos e sementes permaneceu alta na ausência dos polinizadores oligoléticos, respectivamente, *Protomeliturga turnerae* (Ducke, 1907) e *P.*

*catimbaui* Schlindwein & Moure, 2006 (Andrenidae). A abelha introduzida *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 e outros polinizadores poliléticos não foram polinizadores menos eficientes do que as especialistas (Schlindwein e Medeiros, 2006; Penante, 2008). De fato, várias interações entre abelhas oligoléticas e plantas hospedeiras são caracterizadas por uma dependência reprodutiva unilateral, onde as abelhas dependem das plantas como recurso exclusivo de pólen, mas as plantas não dependem dos visitantes especializados para serem polinizadas (Linsley *et al.*, 1963a; b; 1964; Barrows *et al.*, 1976; Grant e Grant, 1979; Grant e Hurd, 1979; Feinsinger, 1983; Schlindwein, 2004; Minckley e Roulston, 2006; Schlindwein e Medeiros, 2006).

### **1.5. A interação entre *Cordia leucocephala* e *Ceblurgus longipalpis***

O gênero cosmopolita *Cordia* (Cordiaceae) compreende cerca de 320 espécies, a maioria delas com flores tubulares distílicas (Gibbs e Taroda, 1983; Taroda e Gibbs, 1986; 1987; Miller, 2001; Gottschling *et al.*, 2005). Espécies do gênero *Cordia* são associadas a um grande espectro de polinizadores tais como abelhas, borboletas, besouros e moscas (Percival, 1974; Opler *et al.*, 1975; Carvalho e Marchini, 1999). *Cordia leucocephala* Moric. é uma planta endêmica da Caatinga, com flores distílicas e tubulares e anteras confinadas na base do tubo floral (Machado, 1990; Melo e Sales, 2005). Até o momento, levantamentos de comunidade abelhas e plantas melíferas desenvolvidos em regiões de Caatinga registraram abelhas de *Ceblurgus longipalpis* Urban & Moure, 1993 (Rophitinae: Halictidae) exclusivamente em flores de *Co. leucocephala* (Aguiar e Martins, 1994; Martins, 1994; Aguiar *et al.*, 1995). *Ce. longipalpis*, endêmica para a região da Caatinga no Nordeste brasileiro, é a única espécie de Rophitinae do Brasil descrita até o momento, (Aguiar e Martins, 1994). Essa abelha apresenta caracteres especiais como glossa e palpos labiais alongados e também pêlos plumosos nas peças bucais, que podem estar relacionadas à coleta de néctar e pólen nas suas flores hospedeiras. Nesse sistema de polinização especializado, as funções das adaptações morfológicas dos parceiros são desconhecidas, bem como o nível de dependência reprodutiva entre a abelha e a planta.

## 1.6. Literatura citada

- Aguiar CML, Martins CF. 1994.** Fenologia e preferência alimentar de *Ceblurgus longipalpis* Urban e Moure, 1993 (Hymenoptera, Halictidae, Dufoureae). *Revista Nordestina de Biologia* **9**: 125-131.
- Aguiar CML, Martins CF, Moura A. 1995.** Recursos florais utilizados por abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em área de Caatinga (São João do Cariri, Paraíba). *Revista Nordestina de Biologia* **10**: 101-117.
- Alves-dos-Santos I. 2002.** Flower-visiting bees and the breakdown of the tristylous breeding system of *Eichornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* **77**: 499-507.
- Alves-dos-Santos I. 2003.** Adaptation of bee proboscides for collecting pollen from Pontederiaceae flowers. In: Melo GAR, Alves-dos-Santos I, eds. *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*. Criciúma: Editora UNESC, 257-263
- Alves-dos-Santos I, Wittmann D. 1999.** The proboscis of the long-tongued *Ancyloscelis* bees (Anthophoridae/Apoidea), with remarks on flowers visits and pollen collecting with the mouthparts. *Journal of the Kansas Entomological Society* **72**: 277-288.
- Alves-dos-Santos I, Wittmann D. 2000.** Legitimate pollination of the tristylous flowers of *Eichornia azurea* (Pontederiaceae) by *Ancyloscelis gigas* bees (Anthophoridae, Apoidea). *Plant Systematics and Evolution* **223**: 127-137.
- Andrews ES, Theis N, Adler LS. 2007.** Pollinator and herbivore attraction to *Curcubita* floral volatiles. *Journal of Chemical Ecology* **33**: 1682-1691.
- Arnold SEJ, Savolainen V, Chittka L. 2009.** Flower colours along an alpine altitude gradient, seen through the eyes of fly and bee pollinators. *Arthropod-Plant Interactions* **3**: 27-43.
- Barrett SCH. 1978.** Heterostyly in a tropical weed: the reproductive biology of the *Turnera ulmifolia* complex (Turneraceae). *Canadian Journal of Botany* **56**: 1715-1725.
- Barrett SCH. 1990.** The evolution and adaptive significance of heterostyly. *Tree* **5**: 144-148.
- Barrett SCH. 2002.** The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* **3**: 274-284.
- 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.

- Bascompte J, Jordano P. 2007.** Plant-animal mutualistic networks: the architecture of biodiversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* **38**: 567-593.
- Bergström G, Dobson HEM, Groth I. 1995.** Spatial fragrance patterns within the flowers of *Ranunculus acris* (Ranunculaceae). *Plant Systematics and Evolution* **195**: 221-242.
- Buchmann SL, Nabhan GP. 1996.** *The forgotten pollinators*. Washington: Island Press.
- Burger H, Dötterl S, Ayasse M. 2010.** Host-plant finding and recognition by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee. *Functional Ecology* **25**: 1234-1240.
- Cane JH, Payne JA. 1988.** Foraging ecology of the bee *Habropoda laboriosa* (Hymenoptera: Anthophoridae), an oligolectic of blueberries (Ericaceae: *Vaccinium*) in the southeastern USA. *Annals of the Entomological Society of America* **81**: 419-427.
- Cane JH, Sipes S. 2006.** Characterizing floral specialization by bees: analytical methods and revised lexicon for oligolecty. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. Chicago: The University of Chicago Press, 99-121.
- Carvalho CAL, Marchini LC. 1999.** Plantas visitadas por *Apis mellifera* L. no vale do rio Paraguaçu, município de Castro Alves, Bahia. *Revista Brasileira de Botânica* **22**: 333-338.
- Chittka L, Raine NE. 2006.** Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 428-435.
- Cruden RW. 1972.** Pollination biology of *Nemophila menziesii* (Hydrophyllaceae) with comments on the evolution of oligolectic bees. *Evolution* **26**: 373-389.
- Darwin C. 1877.** *The different forms of flowers on plants of the same species*. London: John Murray.
- Dobson HEM. 1987.** Role of flower and pollen aromas in host-plant recognition by solitary bees. *Oecologia* **72**: 618-623.
- Dobson HEM, Bergström G. 2000.** The ecology of pollen odors. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 63-87.
- Dobson HEM, Bergström G, Groth I. 1990.** Differences in fragrance chemistry between flower parts of *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae). *Israel Journal of Botany* **39**: 143-156.
- Dobson HEM, Danielson EM, Van Wesep ID. 1999.** Pollen odor chemicals as modulators of bumble bee foraging on *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae). *Plant Species Biology* **14**: 153-166.

- Dobson HEM, Groth I, Bergström G. 1996.** Pollen advertisement: Chemical contrasts between whole-flower and pollen odors. *American Journal of Botany* **83**: 877-885.
- Dobson HEM, Peng YS. 1997.** Digestion of pollen components by larvae of the flower-specialist bee *Chelostoma florissomne* (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of Insect Physiology* **43**: 89-100.
- 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, Vereecken JN. 2010.** The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: a review and perspectives. *Canadian Journal of Zoology* **88**: 668-697.
- Dyer AG, Chittka L. 2004a.** Biological significance of distinguishing between similar colours in spectrally variable illumination: bumblebees (*Bombus terrestris*) as a case study. *Journal of Comparative Physiology A* **190**: 105-114.
- Dyer AG, Chittka L. 2004b.** Bumblebees (*Bombus terrestris*) sacrifice foraging speed to solve difficult colour discrimination tasks. *Journal of Comparative Physiology A* **190**: 759-763.
- Dyer AG, Chittka L. 2004c.** Fine colour discrimination requires differential conditioning in bumblebees. *Naturwissenschaften* **91**: 224-227.
- Eickwort GC, Kukuk PF, Wesley FR. 1986.** The nesting biology of *Dufourea novaeangliae* (Hymenoptera: Halictidae) and the systematic position of the Dufoureae based on behaviour and development. *Journal of the Kansas Entomological Society* **59**: 103-120.
- Feinsinger P. 1983.** Coevolution and pollination. In: Futuyma DJ, Slatkin M, eds. *Coevolution*. Sunderland: Sinauer Associates, 282-310.
- Ganders FR. 1979.** The biology of heterostily. *New Zealand Journal of Botany* **17**: 607-635.
- Gibbs PE. 1990.** Self-incompatibility in flowering plants: a Neotropical perspective. *Revista Brasileira de Botanica* **13**: 125-136.
- Gibbs PE, Taroda N. 1983.** Heterostily in the *Cordia alliodora* – *C. trichotoma* complex in Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* **6**: 1-10.
- Gottschling M, Miller JS, Weigend M, Hilger HH. 2005.** Congruence of phylogeny of Cordiaceae (Boraginales) inferred from ITS1 sequence data with morphology, Ecology, and Biogeography. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **92**: 425-437.

- Grant V, Grant KA. 1979.** Pollination of *Echinocereus fasciculatus* and *Ferocactus wisizenii*. *Plant Systematics and evolution* **132**: 85-90.
- Grant V, Hurd PD. 1979.** Pollination of the Southwestern Opuntias. *Plant Systematics and evolution* **133**: 15-28.
- Guirguis GN, Brindley WA. 1974.** Insecticide susceptibility and response to selected pollens of larval alfalfa leafcutting bees, *Megachile pacifica* (Panzer) (Hymenoptera: Megachilidae). *Environmental Entomology* **3**: 691-694.
- Heywood VH, ed. 1993.** *Flowering plants of the world*. New York: Oxford University Press.
- Howell AD, Alarcón R. 2007.** *Osmia* bees (Hymenoptera: Megachilidae) can detect nectar-rewarding flowers using olfactory cues. *Animal Behaviour* **74**: 199-205.
- Jordano P, Bascompte J, Olesen JM. 2006.** The ecological consequences of complex topology and nested structure in pollination webs. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. Chicago: The University of Chicago Press, 173-199.
- Jürgens A, Dötterl S. 2004.** Chemical composition of anther volatiles in Ranunculaceae: genera-specific profiles in *Anemone*, *Aquilegia*, *Caltha*, *Pulsatilla*, *Ranunculus*, and *Trollius* species. *American Journal of Botany* **91**: 1969-1980.
- Knudsen JT, Eriksson R, Gershenson J, Stahl B. 2006.** Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review* **72**: 1-120.
- Krenn HW, Plant JD, Szucsich NU. 2005.** Mouthparts of flower-visiting insects. *Arthropod, Structure & Development* **34**: 1-40.
- Laroça S, Almeida MC. 1985.** Adaptação dos palpos labiais de *Niltonia virgillii* (Hymenoptera, Apoidea, Colletidae) para coleta de néctar em *Jacaranda puberula* (Bignoniaceae), com descrição do macho. *Revista Brasileira de Entomologia* **29**: 289-297.
- Laroça S, Michener CD, Hofmeister M. 1989.** Long mouthparts among “Short-tongued” bees and the fine structure of the labium in *Niltonia* (Hymenoptera, Colletidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **62**: 400-410.
- Larsson M. 2005.** Higher pollinator effectiveness by specialist than generalist flower-visitors of unspecialized *Knautia arvensis* (Dipsacaceae). *Oecologia* **146**: 394-403.
- Laverty TM, Plowright RC. 1988.** Flower handling by bumblebees: a comparison of specialists and generalists. *Animal Behaviour* **36**: 733-740.
- Linsley EG. 1958.** The ecology of solitary bees. *Hilgardia* **27**: 543-599.

- 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. *Oenofhera* bees of the Great Basin. *University of California Publications in Entomology* **33**: 25-58, 26 pls.
- Linsley EG, Macswain JW, Raven PH. 1964.** Comparative behavior of bees and Onagraceae III. *Oenofhera* bees of the Mojave Desert, California. *University of California Publications in Entomology* **33**: 59-98, 53 pls.
- Linsley EG, Macswain JW, Raven PH, Thorp RW. 1973.** Comparative behavior of bees and Onagraceae V. *Camissonia* and *Oenothera* bees of cismontane California and Baja California. *University of California Publications in Entomology* **71**: 1-68, 66 pls.
- Loew E. 1884.** Beobachtungen über den Blumenbesuch von Insekten an Freilandpflanzen des Botanischen Gartens zu Berlin. *Jahrbuch Königlich Botanischer Garten zu Berlin* **3**: 69-118.
- Loew E. 1886.** Weitere beobachtungen über den Blumenbesuch von Insekten and Freilandpflanzen des Botanischen Gartens zu Berlin. *Jahrbuch Königlich Botanischer Garten zu Berlin* **4**: 93-178.
- Lovell JH. 1912.** Bees which visit only one species of flower. *Popular Science Monthly* **31**: 197-203.
- Lovell JH. 1913.** The origin of the oligotropic habit among bees. *Entomological News* **24**: 104-112.
- Lovell JH. 1914.** The origin of oligotropism. *Entomological News* **25**: 314-321.
- Lunau K. 1995.** Notes on the colour of pollen. *Plant Systematics and Evolution* **198**: 235-252.
- Machado IC. 1990.** *Biologia floral de espécies de Caatinga no município de Alagoinha (PE)*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- Martins CF. 1994.** Comunidade de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) da caatinga e do cerrado com elementos de campo rupestre do estado da Bahia, Brasil. *Revista Nordestina de Biologia* **9**: 225-257.
- Mcintosh ME. 2005.** Pollination of two species of *Ferocactus*: interactions between cactus-specialist bees and their host plants. *Functional Ecology* **19**: 727-734.

- Melo JIM, Sales MF. 2005.** Boraginaceae A. Juss. na região de Xingó: Alagoas e Sergipe. *Hoehnea* **32**: 369-380.
- Michener CD. 1954.** Bees of Panama. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **104**: 1-176.
- Michener CD. 1974.** *The Social Behavior of the Bees*. Cambridge: 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*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.
- Miller JS. 2001.** Two new species of *Cordia* L. (Boraginaceae) from Madagascar. *Adansonia* **23**: 289-295.
- Minckley RL, Roulston TH. 2006.** Incidental mutualisms and pollen specialization among bees. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. Chicago: The University of Chicago Press, 69-98.
- Moldenke AR. 1975.** Niche specialization and species diversity along a California transect. *Oecologia* **21**: 219-242.
- Müller A. 1995.** Morphological specializations in central European bees for the uptake of pollen from flowers with anthers hidden in narrow corolla tubes (Hymenoptera: Apoidea). *Entomologia Generalis* **20**: 43-57.
- Müller A, Bansac N. 2004.** A specialized pollen-harvesting device in western palaeartic bees of the genus *Megachile* (Hymenoptera, Apoidea, Megachilidae). *Apidologie* **35**: 329-337.
- Nilsson LA. 1983.** Mimesis of Bellflower *Campanula* by the Red Helleborine Orchid *Cephalanthera-Rubra*. *Nature* **305**: 799-800.
- Opler PA, Baker HG, Frankie GW. 1975.** Reproductive Biology of some Costa Rican *Cordia* species (Boraginaceae). *Biotropica* **7**: 234-247.
- Penante DCA. 2008.** *Polinização de Turnera hermannioides Cambess (Turneraceae) no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco*. Monografia de bacharelado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
- Percival M. 1974.** Floral ecology of coastal shrub in Southeast Jamaica. *Biotropica* **6**: 104-129.
- Pinheiro M, Schlindwein C. 1998.** A câmara nectarífera de *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae) e abelhas de glossa longa como polinizadores eficientes. *Iheringia, série Botânica* **51**: 3-16.

- 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.
- Robertson C. 1925.** Heterotropic bees. *Ecology* **6**: 412-436.
- Roubik DW. 1989.** *Ecology and natural history of tropical bees*. New York: Cambridge University Press.
- Roulston TH, Cane JH. 2002.** The effect of pollen protein concentration on body size in the sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Apiformes). *Evolutionary Ecology* **16**: 49-65.
- Roulston TH, Cane JH, Buchmann SL. 2000.** What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny? *Ecological Monographs* **70**: 617-643.
- Rozen JG. 1997.** South American Rophitine bees (Hymenoptera: Rophitinae). *American Museum Novitates* **3206**: 1-27.
- Rozen JG, Ruz L. 1995.** South American Panurgine bees (Andrenidae: Panurginae), part II. Adults, Immature stages, and biology of *Neffapis longilingua*, a new genus and species with an elongate glossa. *American Museum Novitates* **3136**: 1-16.
- Schlindwein C. 2004.** Are oligolectic bees always the most effective pollinators? In: Magalhães FB, Pereira JOP, eds. *Solitary bees - Conservation, rearing and management for pollination*. Fortaleza: Imprensa Universitária UFC, 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 cancelata* (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.

- Schindwein C, Wittmann D. 1997a.** Micro-foraging routes of *Bicolletes pampeana* (Colletidae) and bee-induced pollen presentation in *Cajophora arechavaletae* (Loasaceae). *Botanica Acta* **110**.
- Schindwein C, Wittmann D. 1997b.** Stamen movements in flowers of *Opuntia* (Cactaceae) favour oligolectic pollinators. *Plant Systematics and Evolution* **204**: 179-193.
- Schindwein 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.
- Shore JS, Barrett SCH. 1985a.** The genetics of distyly and homostyly in *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). *Heredity* **55**: 167-174.
- Shore JS, Barrett SCH. 1985b.** Morphological differentiation and crossability among populations of *Turnera ulmifolia* L. complex (Turneraceae). *Systematics Botany* **10**: 308-321.
- Strickler K. 1979.** Specialization and foraging efficiency of solitary bees. *Ecology* **60**: 998-1009.
- Taroda N, Gibbs PE. 1986.** Studies on the genus *Cordia* L. (Boraginaceae) in Brazil. 1. A new infrageneric classification and conspectus. *Revista Brasileira de Botanica* **9**: 31-42.
- Taroda N, Gibbs PE. 1987.** Studies on the genus *Cordia* L. (Boraginaceae) in Brazil. 2. An outline taxonomic revision of subgenus *Myxa* Taroda. *Hoehnea* **14**: 31-52.
- Thorp RW. 1979.** Structural, behavioural, and physiological adaptations of bees (Apoidea) for collecting pollen. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **66**: 788-812.
- Thorp RW. 2000.** The collection of pollen by bees. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 211-223.
- Vásquez DP, Aizen MA. 2003.** Null model analyses of specialization in plant-pollinator interactions. *Ecology* **84**: 2493-2501.
- Vásquez DP, Aizen MA. 2006.** Community-wide patterns of specialization in plant-pollinator interactions revealed by null models. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant-*

*pollinator interactions: from specialization to generalization*. Chicago: The University of Chicago Press, 200-219.

**Vuilleumier BS. 1967.** The origin and evolutionary development of heterostyly in the Angiosperms. *Evolution* **21**: 210-226.

**Wcislo WT, Cane JH. 1996.** Floral resource utilization by solitary bees (Hymenoptera: Apoidea) and exploitation of their stored foods by natural enemies. *Annual Review of Entomology* **41**: 257-286.

**Weiner CN, Hilpert A, Werner M, Linsenmair KE, Blüthgen N. 2010.** Pollen amino acids and flower specialisation in solitary bees. *Apidologie* **41**: 476–487.

**Williams NM. 2003.** Use of novel pollen species by specialist and generalist solitary bees (Hymenoptera: Megachilidae). *Oecologia* **134**: 228-237.

\* Citações e referências de acordo com as normas da revista *Annals of Botany*

**Manuscrito a ser submetido à revista *Arthropod-plant interactions***

## **2. Atração inata da abelha oligolética *Chelostoma rapunculi* por sinal visual e olfativo de sua planta hospedeira *Campanula trachelium***

Paulo Milet-Pinheiro<sup>1,2\*</sup>, Manfred Ayasse<sup>2</sup>, Clemens Schindwein<sup>3</sup>, Heidi E. M. Dobson<sup>4</sup>, Stefan Dötterl<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50670-901 Recife, Brasil. (miletpinheiro@hotmail.com).

<sup>2</sup> Instituto de Ecologia Experimental, Universidade de Ulm, Albert-Einstein-Allee 11, 89069 Ulm, Alemanha.

<sup>3</sup> Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50670-901, Recife, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Biologia, Whitman College, Walla Walla, 99362 Washington, USA.

<sup>5</sup> Departamento de Sistemática Vegetal, Universidade de Bayreuth, Universitätstrasse 30, 95447 Bayreuth, Alemanha.

## 2.1. Resumo

*Chelostoma rapunculi* é uma abelha oligolética que coleta pólen apenas em flores de *Campanula* para aprovisionar as células de cria. No entanto, os sinais florais que essas especialistas utilizam para encontrar suas plantas hospedeiras ainda são desconhecidos. O presente estudo visou responder as seguintes questões: 1) Abelhas de *Ch. rapunculi* apresentam uma atração inata por sinais visuais e olfativos de flores de *Campanula trachelium*? 2) Abelhas inexperientes e experientes respondem diferentemente aos sinais florais de *Ca. trachelium*? Para isso, foram desenvolvidos seis experimentos de duas escolhas com abelhas inexperientes e experientes em uma gaiola experimental, onde a atratividade de sinais florais (visuais e olfativos; isolados ou em combinação) foi testada. Abelhas inexperientes e experientes foram atraídas pelos sinais florais isoladamente, quando oferecidas contra um controle vazio, mas sinais visuais isoladamente foram significativamente mais atrativos do que sinais olfativos. A combinação de sinais visuais e olfativos atraiu mais abelhas do que os sinais florais isoladamente. Os diferentes sinais também estimularam respostas comportamentais (aproximação versus pousos) em diferentes proporções. Sinais olfativos estimularam apenas aproximações de abelhas inexperientes, e poucos pousos em abelhas experientes. Alternativamente, sinais visuais estimularam pousos em ambos os grupos, mas a proporção de pousos em abelhas experientes foi significativamente maior do que nas inexperientes. A combinação dos dois sinais, no entanto, sempre foi mais efetiva em estimular pousos de abelhas (inexperientes e experientes), indicando uma atuação sinérgica. No presente estudo, conclui-se que sinais florais visuais e olfativos de *Ca. trachelium* apresentam diferentes funções na atração da abelha oligolética *Ch. rapunculi* e que a atuação sinérgica de ambos é responsável pelo reconhecimento das fontes exclusivas de pólen.

**Palavras chave:** abelhas oligoléticas, *Campanula*, *Chelostoma*, comportamento de forrageio, ecologia cognitiva, sinais florais.

## 2.2. Introdução

As abelhas são os principais agentes polinizadores de angiospermas e visitam as flores em busca, principalmente, de energia (néctar) e alimentação para suas larvas, principalmente pólen e néctar (Michener 1974; Roubik 1989). Enquanto a maioria das espécies de abelhas coleta pólen em plantas melitófilas de famílias diferentes, outras espécies restringem a coleta de pólen a plantas de uma única família, gênero ou até mesmo de uma única espécie (Robertson 1925). Tais abelhas especialistas são conhecidas como oligoléticas e, de acordo com o seu nível de especialização, são categorizadas como monoléticas (uma única planta hospedeira) estreitamente oligolética (plantas do mesmo clado de uma única família) e ecleticamente oligoléticas (plantas de dois a quatro gêneros de duas a três famílias) (Cane e Sipes 2006).

A oligoetia é um fenômeno interessante que acarreta uma série de implicações ecológicas, evolutivas e fisiológicas (Wcislo e Cane 1996). Entre as questões intrigantes que surgem da oligoetia, uma suscita atenção especial: quais sinais florais abelhas oligoléticas utilizam para encontrar suas plantas hospedeiras? Atualmente, sabe-se que sinais visuais e olfativos de flores desempenham papéis diferentes, mas sinérgicos, na atração de abelhas (Chittka e Raine 2006). Embora a exata função de estímulos visuais a longas distâncias ainda seja controversa, a pequenas distâncias (no máximo um metro) as abelhas são capazes de detectar cores e/ou padrões de cores das flores, o que pode estimular vôo em direção às flores e pouso (Chittka e Raine 2006; Giurfa e Lehrer 2001; Lunau 1991, 1992, 1995, 2000; Lunau e Maier 1995; Simonds e Plowright 2004).

Sinais olfativos, por sua vez, podem atrair abelhas a longas distâncias, em alguns casos mais de 1 km, como nas abelhas euglossines (Dressler 1982). A pequenas distâncias, no entanto, voláteis florais parecem desempenhar um papel mais sutil, como na discriminação de flores de diferentes espécies (Ayasse et al. 2000) e na avaliação da disponibilidade de recursos florais (Dobson et al. 1999; Dobson e Bergström 2000; Giurfa et al. 1995; Howell e Alarcón 2007). As abelhas, nos seus primeiros vôos de forrageio, precisam encontrar novos recursos florais. Abelhas sociais sem experiência de forrageio, por exemplo, usam cheiros florais já aprendidos nas colméias, recrutamento ou danças para encontrar fontes de alimento (von Frisch 1923; Jarau e Hrnčir 2009; Lindauer e Kerr 1960). Abelhas oligoléticas solitárias, no entanto, não têm contato com suas progenitoras e, portanto, têm que encontrar suas fontes específicas de pólen sozinhas.

Atualmente, poucos estudos foram realizados com o intuito de avaliar quais sinais florais são utilizados por abelhas oligoléticas para encontrar suas fontes específicas de pólen. Ainda assim, o padrão geral que tem sido observado sugere que abelhas inexperientes usam sinais visuais e olfativos para encontrar as plantas hospedeiras (Burger et al. 2008, 2010; Dobson 1987; Dobson e Bergström 2000). Dobson e Bergström (2000), por exemplo, reportaram que abelhas inexperientes de *Chelostoma florissomne* (Megachilidae) utilizam uma combinação de sinal visual (amarelo) e olfativo (o composto floral raro protoanemonina) para encontrar flores hospedeiras de *Ranunculus* (Ranunculaceae). Em outro sistema, Burger et al. (2008, 2010) mostraram que abelhas inexperientes da espécie oligolética *Hoplitis adunca* (Megachilidae) respondem apenas a sinais visuais isoladamente, mas que a combinação de ambos os sinais foi mais efetiva em atrair e estimular pousos das abelhas. Nesse contexto, parece pouco provável que o reconhecimento de plantas hospedeiras por abelhas oligoléticas dependa de um único sinal, mas sim de uma combinação de pelo menos dois sinais florais.

*Chelostoma rapunculi* (Lepelletier 1841) (Megachilidae) é uma abelha estreitamente oligolética que coleta pólen para suas larvas exclusivamente em flores de *Campanula* (Campanulaceae) (Schlindwein et al. 2005; Sedivy et al. 2008; Westrich 1989). No entanto, os meios que essas especialistas utilizam para encontrar suas plantas hospedeiras ainda não são bem entendidos. O presente estudo objetivou avaliar os sinais florais utilizados por *Ch. rapunculi* para encontrar plantas hospedeiras de *Ca. trachelium*. As seguintes questões foram levantadas: 1) Abelhas de *Ch. rapunculi* apresentam uma atração inata por sinais visuais e olfativos (isoladamente ou em combinação) de flores de *Ca. trachelium*? 2) Abelhas inexperientes e experientes respondem diferentemente aos sinais florais visuais e olfativos de *Ca. trachelium*?

## **2.3. Material e Métodos**

### **2.3.1. Espécies estudadas**

*Campanula trachelium* L. é uma erva perene amplamente distribuída na Alemanha que floresce entre junho e setembro (Schmeil e Fitschen 2003). Suas flores, de coloração violeta a lilás, são protândricas e auto-incompatíveis. O pólen é apresentado secundariamente em um estilete coberto por tricomas invagináveis (Shetler 1979). *Ca. trachelium* é polinizada por vários insetos, incluindo abelhas oligoléticas do gênero *Chelostoma* (Binnenböse 1995) (Fig. 1).

*Chelostoma rapunculi* (Lepelletier 1841) (Megachilidae) é uma abelha solitária univoltina, ativa do início de junho ao final de agosto na Alemanha. Essa abelha nidifica em cavidades pré-existentes em madeira velha, mas também em ninhos armadilhas (Westrich 1989).



**Fig. 1** Fêmea de *Chelostoma rapunculi* coletando pólen em uma flor de *Campanula trachelium*.

### **2.3.2. Gaiola experimental**

Do início de junho até o final de Julho de 2009 e 2010, respostas comportamentais de machos e fêmeas de *Ch. rapunculi* aos sinais visuais e olfativos de *Ca. trachelium* foram estudadas em uma gaiola experimental (7,2 x 3,6 x 2,2m), a mesma utilizada por Dötterl e Schäffler (2007). A gaiola foi construída no interior de uma casa de vegetação, no Jardim Botânico da Universidade de Bayreuth, Alemanha. Ninhos armadilhas com abelhas imaturas de *Ch. rapunculi* (adquiridos de populações naturais em Göttingen e Knüllwald) foram colocados na gaiola no final de Maio. Para prevenir qualquer contato prévio das abelhas recém-emergidas com plantas hospedeiras, nenhuma planta de *Ca. trachelium* foi colocada na gaiola até o término de todos os experimentos comportamentais com abelhas inexperientes. Nessa fase, as plantas hospedeiras não foram disponibilizadas e as abelhas foram alimentadas com alimentadores artificiais (esponjas com água açucarada a uma concentração de 30%, frutose e glicose 1:1) e flores melitófilas não hospedeiras (*Geranium pratense*, *Lythrum salicaria*, *Brassica* sp.). Nessas condições, as abelhas permaneceram inexperientes em relação ao forrageio em flores de plantas hospedeiras. Dentro da gaiola, as abelhas

inexperientes copularam e forragearam em busca de néctar nas flores de plantas não hospedeiras e alimentadores artificiais. Após a inserção de plantas hospedeiras, as abelhas, então experientes, copularam, coletaram pólen e néctar nas plantas hospedeiras e nidificaram nos ninhos armadilhas (latas cilíndricas de 1 ℓ, preenchidas com ramos secos de *Phragmites australis* - Poaceae) que foram disponibilizados.

### 2.3.3. Experimentos comportamentais

O papel de sinais visuais e olfativos (isolados ou em combinação) de inflorescências de *Ca. trachelium* na atração de machos e fêmeas de *Ch. rapunculi* foi determinado em experimentos de duas escolhas com abelhas inexperientes e experientes. Inflorescências de *Ca. trachelium* foram cobertas com diferentes cilindros de vidro de quartzo (29 cm de comprimento, 10 cm de diâmetro), de tal forma que somente o sinal floral desejado foi apresentado às abelhas.

A atração das abelhas por sinais olfativos isoladamente foi testada utilizando-se um cilindro preto com 60 orifícios (diâmetro de 0,2 cm). O cilindro foi pintado com um verniz preto fosco e, durante uma semana, foi deixado em uma estufa a 50°C para eliminar a emissão de cheiro do verniz. O ar no interior do cilindro, enriquecido com os voláteis das inflorescências, foi então soprado através dos orifícios por uma bomba de membrana (G12/01 EB, Rietschle Thomas, Puchheim, Alemanha) a um fluxo contínuo de 1 ℓ/min. Para testar a atração das abelhas por sinais visuais isoladamente, inflorescências foram encobertas com um cilindro transparente sem orifícios. Por fim, para testar a atratividade dos sinais visuais e olfativos em combinação, inflorescências foram encobertas com um cilindro transparente com 60 orifícios. O ar no interior do cilindro foi soprado como descrito para o cilindro preto.

Seis experimentos de duas escolhas foram então desenvolvidos, na seguinte ordem: 1) Sinal olfativo vs. controle vazio (cilindro preto com orifícios); 2) Sinal visual vs. controle vazio (cilindro transparente fechado); 3) Sinal visual + olfativo vs. controle vazio (cilindro transparente com orifícios); 4) Sinal olfativo vs. visual; 5) Sinal visual + olfativo vs. olfativo e 6) Sinal visual + olfativo vs. visual.

Os experimentos comportamentais foram desenvolvidos apenas em dias ensolarados, entre 10:00 e 15:00 h, horário de maior atividade das abelhas. Cada experimento teve duração de 30min, dividido em duas seções de 15 min, quando a posição dos dois cilindros foi trocada. Os cilindros foram colocados a uma distância de um metro e meio.

As respostas das abelhas foram registradas como aproximações (vôos em direção ao cilindro até uma distância de 5 cm ou menos) ou pousos (aproximações seguidas de pouso). As abelhas que responderam aos cilindros foram coletadas, marcadas individualmente e armazenadas em uma caixa térmica até o fim do experimento em andamento, quando foram liberadas na gaiola experimental. Dessa forma, um indivíduo participou apenas uma vez em um determinado experimento.

Após o término de todos os experimentos com abelhas inexperientes, plantas de *Ca. trachelium* foram colocadas na gaiola, para que as abelhas adquirissem experiência de forrageio em suas plantas hospedeiras. Devido a fatores estocásticos, tais como morte e eventualmente fuga, o número total de abelhas na gaiola variou entre os experimentos (entre 25 e 50 indivíduos). Abelhas experientes adicionais foram coletadas no Jardim Botânico da Universidade de Bayreuth e colocadas na gaiola. Após três dias de forrageio na gaiola, os experimentos com as abelhas, agora experientes, foram desenvolvidos. Antes de cada experimento, plantas de *Ca. trachelium* foram removidas da gaiola experimental (entre 07:00 e 08:00 h) e, ao fim dos testes, recolocadas.

#### **2.3.4. Testes estatísticos**

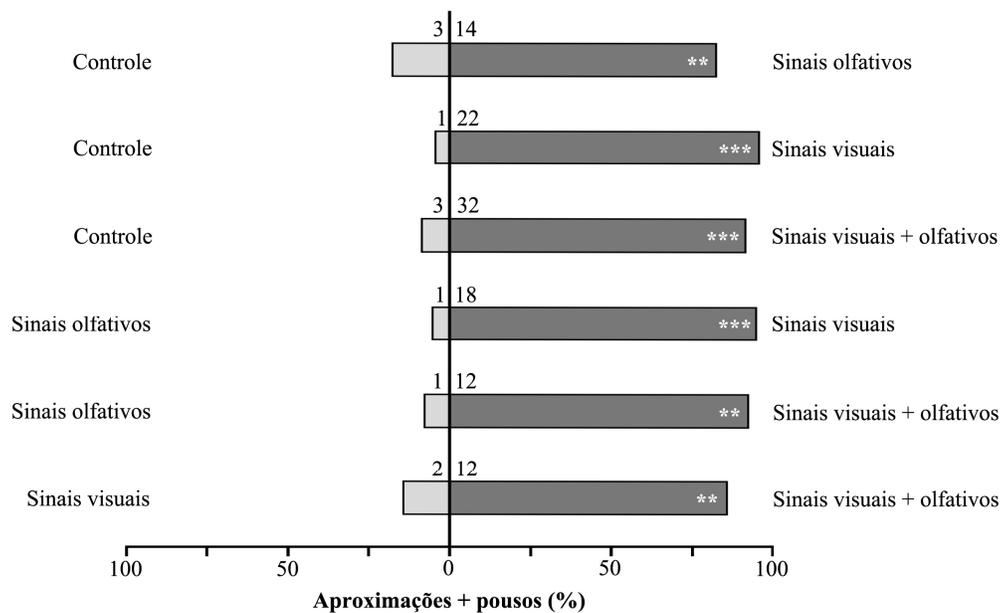
A diferença na resposta total das abelhas (aproximações e pousos) aos dois cilindros em cada experimento comportamental foi verificada a partir de testes de Qui-quadrado, considerando eventos observados versus esperados. Diferenças nos dois tipos de respostas comportamentais (aproximações ou pousos) em relação aos diferentes sinais florais foram verificadas a partir de testes de tabelas de contingências 2 x 2 (abelhas inexperientes) e 2 x 3 (abelhas experientes), onde foram comparadas as respostas das abelhas a: 1) sinais olfativos; 2) sinais visuais e 3) sinais olfativos + visuais. Para isso, foram consideradas as respostas comportamentais dos experimentos nos quais os sinais florais (isoladamente ou em combinação) foram oferecidos contra um controle vazio. Comparações *a posteriori* dos dois tipos de respostas comportamentais das abelhas experientes aos diferentes sinais florais foram realizadas com tabelas de contingência 2 x 2. Por fim, tabelas de contingência 2 x 2 foram utilizadas para comparar, separadamente para cada sinal floral, respostas comportamentais (aproximações ou pousos) de abelhas inexperientes e experientes. Todos os testes foram realizados no programa Statistica (StatSoft 2004), excetuando-se a tabela de contingência 2 x 3, realizada na página [www.physics.csbsju.edu/stats/contingency](http://www.physics.csbsju.edu/stats/contingency) (Kirkman 1996). Para todos os experimentos, as respostas de machos e fêmeas foram agrupadas, uma vez que os

indivíduos dos dois sexos responderam de forma similar aos diferentes sinais florais (Milet-Pinheiro et al. capítulo 3).

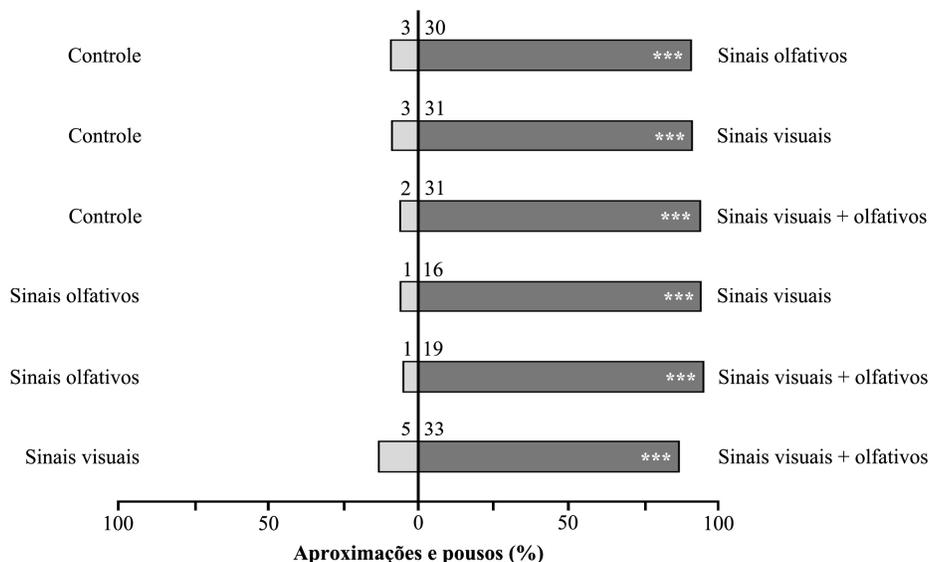
## 2.4. Resultados

### 2.4.1. Experimentos comportamentais

Sinais visuais e olfativos de *Ca. trachelium* isoladamente foram mais atrativos (em termos de aproximações e pousos) para abelhas inexperientes e experientes de *Ch. rapunculi* do que o controle vazio. No entanto, sinais visuais foram mais atrativos para as abelhas quando oferecidos contra sinais olfativos. Sinais visuais e olfativos atuaram sinergicamente e foram mais atrativos do que os sinais isoladamente, tanto para abelhas inexperientes (Fig. 2) quanto para as experientes (Fig. 3).



**Fig. 2** Respostas (aproximações + pousos) de abelhas inexperientes de *Chelostoma rapunculi* (machos e fêmeas) a sinais olfativos e visuais (isoladamente ou em combinação) de inflorescências de *Campanula trachelium* em experimentos comportamentais de duas escolhas. Os números acima das barras indicam o número absoluto de aproximações e pousos. Diferença nas respostas em cada experimento de duas escolhas foi verificada a partir de testes de Qui-quadrado,  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*)

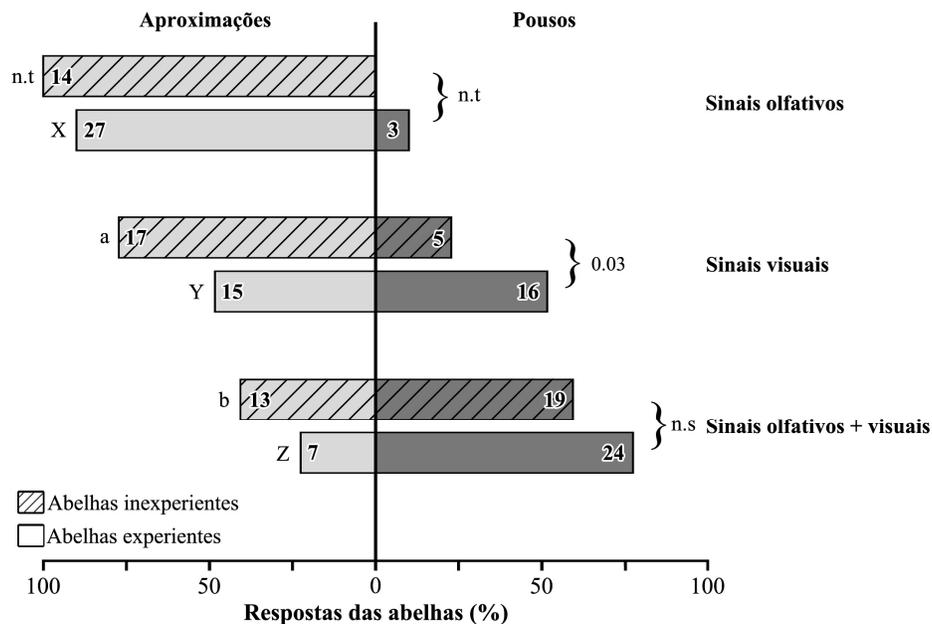


**Fig. 3** Respostas (aproximações + pousos) de abelhas experientes de *Chelostoma rapunculii* (machos e fêmeas) a sinais olfativos e visuais (isoladamente ou em combinação) de inflorescências de *Campanula trachelium* em experimentos comportamentais de duas escolhas. Os números acima das barras indicam o número absoluto de aproximações e pousos. Diferença nas respostas em cada experimento de duas escolhas foi verificada a partir de testes de Qui-quadrado,  $p < 0,001$  (\*\*\*)

Os dois sinais florais testados estimularam respostas comportamentais significativamente diferentes, em termos de proporção relativa de aproximações e pousos, em abelhas inexperientes e experientes (Fig. 4). Para ambos os grupos de abelhas, houve um aumento progressivo no percentual de indivíduos que pousou (em comparação com as aproximações) dos sinais olfativos isoladamente para sinais visuais isoladamente e, finalmente, para uma combinação de ambos os sinais. Adicionalmente, observou-se uma tendência geral de que abelhas experientes apresentaram uma maior proporção de pousos do que as inexperientes.

Em abelhas inexperientes, sinais olfativos estimularam apenas aproximações (Fig. 4). Sinais visuais, por sua vez, estimularam predominantemente aproximações (77,3% das respostas das abelhas), mas também alguns pousos (22,7%). Os pousos se tornaram mais frequentes (59,4% das respostas das abelhas) apenas quando os sinais visuais e olfativos foram oferecidos simultaneamente. Em abelhas experientes, sinais olfativos estimularam mais aproximações (90% das abelhas) do que pousos (10%), sinais visuais resultaram em frequências iguais de aproximações e pousos, mas, novamente, a combinação de ambos os sinais levou a um maior número de pousos (77,4%) do que aproximações (22,6%).

A comparação entre aproximações e pousos entre abelhas inexperientes e experientes em relação a cada sinal floral evidencia diferenças adicionais. Sinais olfativos, por exemplo, não estimularam pousos em abelhas inexperientes (tornando a realização de testes estatísticos inapropriada), mas estimularam pousos em baixa frequência (10%) em abelhas experientes. Para sinais visuais, a frequência de pousos de abelhas inexperientes (22,7%) foi significativamente menor do que a de abelhas experientes (51,6%). Por fim, quando ambos os sinais foram oferecidos em combinação, abelhas inexperientes e experientes pousaram em frequências similares (Fig. 4).



**Fig. 4** Respostas comportamentais (aproximação ou pouso) de abelhas inexperientes e experientes de *Chelostoma rapunculi* aos sinais florais olfativos, visuais e olfativos + visuais de inflorescências de *Campanula trachelium* em experimentos de duas escolhas. Os números no interior das barras indicam o número absoluto de aproximações e pousos. Letras minúsculas distintas (a, b) indicam diferença significativa na distribuição de aproximações e pousos das abelhas inexperientes entre os diferentes sinais florais ( $\chi^2 = 7,09$ ; d.f = 1;  $p < 0,01$ ; tabela de contingência 2x2). Letras maiúsculas distintas (X, Y, Z) indicam diferença significativa na resposta das abelhas experientes entre os sinais florais, avaliada primeiramente por uma tabela de contingência 2 x 3 ( $\chi^2 = 30,4$ ; d.f = 2;  $p < 0,001$ ) e, então, por tabelas de contingência 2 x 2 como testes *a posteriori*: 1) sinais olfativos vs. visuais ( $\chi^2 = 12,3$ ; d.f. = 1;  $p < 0,001$ ); 2) visuais + olfativos vs. olfativos ( $\chi^2 = 28,1$ ; d.f. = 1;  $p < 0,001$ ) e 3) visuais + olfativos vs. visuais ( $\chi^2 = 4,51$ ; d.f. = 1;  $p < 0,05$ ). Diferenças entre as respostas das abelhas inexperientes e experientes a cada sinal floral foram testadas usando tabela de contingência (2 x 2) e estão apresentadas no lado direito das barras no gráfico. n.t. indica diferença não testada e n.s. indica diferença não significativa ( $p > 0,05$ ).

## 2.5. Discussão

As respostas comportamentais de abelhas inexperientes de *Chelostoma rapunculi* mostram que essa espécie é atraída de forma inata por sinais florais olfativos e visuais de plantas hospedeiras de *Campanula trachelium*, o que corrobora os resultados reportados para a abelha oligolética *Hoplitis adunca* (Burger et al. 2008). Enquanto esses estudos focaram na atração inata de abelhas por flores de plantas hospedeiras contra controles vazios, a preferência inata de abelhas oligoléticas por flores hospedeiras contra não hospedeiras, baseada em sinais olfativos e visuais, também tem sido documentada (Burger et al. 2010; Dobson 1987; Dobson e Bergström 2000). Atualmente, existem duas hipóteses principais para explicar a atratividade inata das abelhas oligoléticas por flores de suas plantas hospedeiras: 1) condicionamento aos voláteis de pólen durante o estágio larval (Dobson 1987; Linsley 1958) e 2) preferência inata por sinais florais controlada por adaptações neurológicas, geneticamente determinadas (Praz et al. 2008a; Sedivy et al. 2008). De fato, alguns estudos experimentais têm encontrado que abelhas inexperientes podem utilizar voláteis de pólen, em combinação com sinais visuais, para reconhecer flores de plantas hospedeiras (Dobson 1987; Dobson e Bergström 2000), o que poderia ser explicado por ambas as hipóteses. No entanto, em um estudo recente, a abelha oligolética *Heriades truncorum* preferiu o pólen de suas flores hospedeiras originais (Asteraceae) mesmo que, enquanto larva, tivesse sido alimentada com fontes alternativas de pólen (*Echium vulgare*: Boraginaceae e *Campanula rotundifolia*: Campanulaceae). Isso sugere que, pelo menos nessa espécie, a preferência por plantas hospedeiras é geneticamente controlada, o que ainda precisa ser mostrado para *Ch. rapunculi*. O fato de que larvas de *Ch. rapunculi* não se desenvolvem eficientemente em pólen de plantas alternativas, provavelmente por limitações fisiológicas, sugere que o controle genético está envolvido de alguma forma na restrição alimentar de abelhas oligoléticas (Praz et al. 2008b). Estudos adicionais com diferentes espécies de abelhas oligoléticas são necessários para determinar até que ponto as observações de Praz et al. (2008a) poderia ser aplicada para abelhas oligoléticas em geral.

A diferença na proporção de respostas comportamentais de abelhas inexperientes de *Ch. rapunculi* aos sinais olfativos (somente aproximações), comparadas com a resposta aos sinais visuais (aproximações e pousos), sugere que estes sinais desempenham funções distintas na atratividade e no reconhecimento das plantas hospedeiras. Além do mais, quando os dois sinais foram oferecidos um contra o outro, sinais visuais atraíram mais abelhas do que sinais olfativos.

Atualmente, sabe-se que as cores das flores desempenham um papel importante na atração de abelhas oligoléticas (Dötterl e Vereecken 2010). Burger et al. (2010), por exemplo, reportaram que abelhas inexperientes de *Hoplitis adunca* apresentam uma atração e preferência inata pela cor das flores de plantas hospedeiras (*Echium* spp.), e que isso seria o primeiro passo para a localização de sua fonte de pólen. De fato, flores artificiais azuis, simulando as cores das flores de *Echium*, foram extremamente atrativas para essas especialistas, o que não foi observado para flores artificiais amarelas. Algumas evidências sugerem que isso também deve ser verdade para *Ch. rapunculi*. Por exemplo, a orquídea de engano *Cephalanthera rubra*, que não oferece recompensa e floresce um pouco antes de espécies de *Campanula*, explora a atividade de machos recém-emergidos de *Ch. rapunculi*, mimetizando a cor de flores de *Campanula* (Nilsson 1983). O perianto de *Ce. rubra* reflete cores de forma muito similar às flores de três espécies de *Campanula*, inclusive *Ca. trachelium*, onde os machos tomam néctar, dormem e copulam (Westrich 1989). Nesse sistema de engano, Nilsson (1983) interpretou que os sinais visuais de flores de *Ce. rubra* teriam um papel primordial na atração dos seus polinizadores (machos de *Ch. rapunculi*), enquanto que a forma ou os perfumes florais desempenhariam pouca ou nenhuma função. O fato de sinais visuais terem sido predominantes sobre os olfativos sugere que o forrageio *Ch. rapunculi* é orientado primeiramente por sinais visuais (e.g. cor) e que isso deve ser o primeiro passo no processo de localização das plantas hospedeiras.

Sinais olfativos isoladamente foram mais atrativos para abelhas inexperientes e experientes de *Ch. rapunculi* do que controles vazios, mas foram menos atrativos do que sinais visuais. Isso não quer dizer, no entanto, que os voláteis florais desempenham uma função coadjuvante na localização e reconhecimento de flores hospedeiras. De fato, voláteis florais são muito importantes na “comunicação” entre abelhas e flores. A composição de odores, por exemplo, varia muito entre diferentes partes de uma mesma flor (e.g. pétala, anteras, néctar e pólen), mas também entre flores de diferentes espécies vegetais. Consequentemente, essa variação é uma importante fonte de “informação” que as abelhas podem utilizar para discriminar espécies vegetais e avaliar a disponibilidade de recursos florais, tais como néctar e pólen, em uma determinada flor (Bergström et al. 1995; Dobson e Bergström 2000; Dobson et al. 1987; 1990; 1996; 1999). Em espécies vegetais associadas com abelhas oligoléticas, acredita-se que voláteis táxon-específicos de flores e/ou pólen são a chave para o reconhecimento das plantas hospedeiras (Dobson e Bergström 2000; Dötterl e Vereecken 2010). No entanto, nenhum dos poucos estudos realizados até o momento

evidenciou substâncias exclusivas em plantas hospedeiras. Análises do buquê de odores de *Ca. trachelium* e outras espécies de *Campanula* podem ajudar a revelar se existem voláteis florais exclusivos em plantas desse gênero que poderiam atuar como chave para o reconhecimento das plantas hospedeiras por *Ch. rapunculi*.

A combinação entre sinais florais visuais e olfativos de *Ca. trachelium* foi mais atrativa às abelhas inexperientes de *Ch. rapunculi*, e mais efetiva em estimular pousos, do que os sinais individualmente. Isso demonstra que os sinais florais atuam sinergeticamente na atração das abelhas e que respostas comportamentais como pouso são mais efetivamente estimuladas pela atuação conjunta dos sinais, o que reforça as evidências obtidas em outros estudos. Em *Hoplitis adunca*, especializada no pólen de *Echium*, Burger et al. (2008) mostraram que sinais visuais e olfativos separadamente estimularam aproximações das abelhas, mas poucos pousos, e que apenas a combinação desses dois sinais foi eficiente em estimular pousos. Assim, a atuação conjunta de sinais florais foi responsável pela localização e reconhecimento de plantas hospedeiras de *Echium vulgare* pelas abelhas (Burger et al. 2010). De maneira similar, Dobson e Bergström (2000) reportaram que, em quatro espécies de abelhas oligoléticas, respostas comportamentais (i.e. pouso e extensão de probóscide) são estimuladas apenas na presença de estímulos visuais (cor) e olfativos (odores florais). Em conjunto, esses resultados mostram que sinais florais atuam sinergeticamente e que a localização e reconhecimento de plantas hospedeiras por abelhas oligoléticas, inclusive *Ch. rapunculi*, dependem de múltiplos sinais.

As diferenças na proporção de respostas comportamentais entre abelhas inexperientes e experientes de *Ch. rapunculi* aos sinais florais demonstram que, após adquirir experiência de forrageio, as abelhas respondem mais efetivamente aos sinais de uma maneira geral. As abelhas experientes, quando comparadas com as inexperientes, foram atraídas similarmente pelos sinais florais de *Ca. trachelium* (isoladamente ou em combinação), mas a frequência de pouso foi maior, indicando uma maior capacidade de reconhecimento das plantas hospedeiras. Os resultados sugerem que abelhas “aprenderam” os sinais florais de *Ca. trachelium* durante suas visitas florais na gaiola, e que sinais visuais assumem uma maior importância na atração de abelhas experientes, possivelmente permitindo uma localização mais rápida das flores hospedeiras. No entanto, a atuação sinérgica que sinais visuais e olfativos apresentaram na atração das abelhas não se alterou com a atividade de forrageio, refletindo a natureza multimodal contínua em que as abelhas percebem suas flores hospedeiras.

No presente trabalho, conclui-se que abelhas inexperientes de *Ch. rapunculi* utilizam tanto sinais visuais quanto olfativos para encontrar as flores da planta hospedeira *Ca. trachelium* e que esses sinais atuam sinergeticamente, promovendo atração e pouso das abelhas. Os resultados mostram também que, após adquirir experiência de forrageio nas flores de plantas hospedeiras, as abelhas respondem mais efetivamente aos sinais florais visuais e olfativos isoladamente, apesar da maior proporção de pouso ainda ser estimulada na presença de ambos os sinais. Neste estudo foram identificados os sinais florais da planta hospedeira *Ca. trachelium* responsáveis pela atração de *Ch. rapunculi*. No entanto, o exato meio em que as abelhas discriminam flores de plantas hospedeiras daquelas de não hospedeiras ainda precisa ser determinado.

## 2.6. Agradecimentos

Nós agradecemos a Hannah Burger e Irmgard Schäffler pelo suporte metodológico e discussões construtivas, a Hans-Joachim Flügel (Lebendiges Bienenmuseum Knüllwald) e Jochen Fründ (Universität Göttingen, Alemanha) por fornecerem os ninhos de *Chelostoma rapunculi*. Bolsas foram fornecidas a Paulo Milet-Pinheiro (DAAD/CNPq/CAPES) e Clemens Schlindwein (CNPq/CAPES).

## 2.7. Literatura citada

- Ayasse M, Schiestl FP, Paulus HF, Löfstedt C, Hansson B, Ibarra F, Francke W (2000) Evolution of reproductive strategies in the sexually deceptive orchid *Ophrys sphegodes*: how does flower-specific variation of odor signals influence reproductive success? *Evolution* 54:1995-2006
- Bergström G, Dobson HEM, Groth I (1995) Spatial fragrance patterns within the flowers of *Ranunculus acris* (Ranunculaceae). *Plant Syst Evol* 195:221-242
- Binnenböse S (1995) Blüten- und Reproduktionsbiologie von *Campanula*. Monografia de bacharelado, Universität Ulm
- Burger H, Dötterl S, Ayasse M (2008) Importance of olfactory and visual cues of *Echium* for host-plant finding of the oligolectic bee *Osmia adunca* (Megachilidae). *Mitt Dtsch Ges Allg Angew Ent* 16:163-166
- Burger H, Dötterl S, Ayasse M (2010) Host-plant finding and recognition by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee. *Funct Ecol* 24:1234-1240

- Cane JH, Sipes S (2006) Characterizing floral specialization by bees: analytical methods and revised lexicon for oligolecty. In: Waser NM, Ollerton J (eds) Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization, 1<sup>a</sup> ed. The University of Chicago Press, Chicago, pp 99-121
- Chittka L, Raine NE (2006) Recognition of flowers by pollinators. *Curr Opin Plant Biol* 9:428-435
- Dobson HEM (1987) Role of flower and pollen aromas in host-plant recognition by solitary bees. *Oecologia* 72:618-623
- Dobson HEM, Bergström G (2000) The ecology of pollen odors. *Plant Syst Evol* 222:63-87
- Dobson HEM, Bergström G, Groth I (1990) Differences in fragrance chemistry between flower parts of *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae). *Israel J Bot* 39:143-156
- Dobson HEM, Bergström J, Bergström G, Groth I (1987) Pollen and Flower Volatiles in Two *Rosa* species. *Phytochemistry* 26:3171-3174
- Dobson HEM, Danielson EM, Van Wesep ID (1999) Pollen odor chemicals as modulators of bumble bee foraging on *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae). *Plant Species Biol* 14:153-166
- Dobson HEM, Groth I, Bergström G (1996) Pollen advertisement: Chemical contrasts between whole-flower and pollen odors. *Am J Bot* 83:877-885
- Dötterl S, Schäßler I (2007) Flower scent of floral oil-Producing *Lysimachia punctata* as attractant for the oil-bee *Macropis fulvipes*. *J Chem Ecol* 33:441-445
- Dötterl S, Vereecken JN (2010) The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: a review and perspectives. *Can J Zool* 88:668-697
- Dressler RL (1982) Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annu Rev Ecol Syst* 13:373-394
- Giurfa M, Lehrer M (2001) Honeybee vision and floral display: from detection to close-up recognition. In: Chittka L, Thompson JN (eds) *Cognitive Ecology of pollination*, 1<sup>a</sup> ed. Cambridge University Press, Cambridge, pp 61-82
- Giurfa M, Núñez J, Chittka L, Menzel R (1995) Colour preferences of flower-naive honeybees. *J Comp Physiol A* 177:247-259
- Howell AD, Alarcón R (2007) *Osmia* bees (Hymenoptera: Megachilidae) can detect nectar-rewarding flowers using olfactory cues. *Anim Behav* 74:199-205
- Jarau S, Hrcir M (2009) Food exploitation by social insects - Ecological, behavioral, and theoretical approaches, 1<sup>a</sup> ed. CRC Press, Boca Raton

- Kirkman, TW (1996) Statistics to Use. <http://www.physics.csbsju.edu/stats/>. Acessado em 23 de novembro de 2009
- Lindauer M, Kerr WE (1960) Communication between the workers of stingless bees. *Bee World* 41:29-71
- Linsley EG (1958) The ecology of solitary bees. *Hilgardia* 27:543-599
- Lunau K (1991) Innate flower recognition in bumblebees (*Bombus terrestris*, *B. lucorum*; Apidae): optical signals from stamens as landing reaction releasers. *Ethology* 88:203-214
- Lunau K (1992) Innate recognition of flowers by bumble bees: Orientation of antennae to visual stamen signals. *Can J Zool* 70:2139-2144
- Lunau K (1995) Notes on the colour of pollen. *Plant Syst Evol* 198:235-252
- Lunau K (2000) The ecology and evolution of visual pollen signals. *Plant Syst Evol* 222:89-111
- Lunau K, Maier EJ (1995) Innate colour preferences of flower visitors. *J Comp Physiol A* 177:1-19
- Michener CD (1974) *The Social Behavior of the Bees*. Harvard University Press, Cambridge
- Nilsson LA (1983) Mimesis of Bellflower *Campanula* by the Red Helleborine Orchid *Cephalanthera-Rubra*. *Nature* 305:799-800
- Praz CJ, Müller A, Dorn S (2008a) Host recognition in a pollen-specialist bee: evidence for a genetic basis. *Apidologie* 39:547-557
- Praz CJ, Müller A, Dorn S (2008b) Specialized bees fail to develop on non-host pollen: do plants chemically protect their pollen. *Ecology* 89:795-804
- Robertson C (1925) Heterotropic bees. *Ecology* 6:412-436
- Roubik DW (1989) *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge University Press, New York
- Schlindwein C, Wittmann D, Martins CF, Hamm A, Siqueira JA, Schiffler D, Machado IC (2005) Pollination of *Campanula rapuncululus* L. (Campanulaceae): how much pollen flows into pollination and into reproduction of oligolectic pollinators? *Plant Syst Evol* 250:147-156
- Schmeil O, Fitschen J (2003) *Flora von Deutschland und angrenzender länder*. Quelle + Meyer, Stuttgart

- 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
- Shetler SG (1979) Pollen-collecting hairs of *Campanula* (Campanulaceae), I: Historical review. *Taxon* 28:205-215
- Simonds V, Plowright CMS (2004) How do bumblebees first find flowers? Unlearned approach responses and habituation. *Anim Behav* 67:379-386
- StatSoft I (2004) STATISTICA (data analysis software system). version 7.0.
- von Frisch K (1923) Über die "Sprache" der Bienen. *Zool Jahrb Abt Allg Zool Physiol Tiere* 40:1-186
- Wcislo WT, Cane JH (1996) Floral resource utilization by solitary bees (Hymenoptera: Apoidea) and exploitation of their stored foods by natural enemies. *Annu Rev Entomol* 41:257-286
- Westrich P (1989) Die Wildbienen Baden-Württembergs: Spezieller Teil: Die Gattungen und Arten, vol 2. Eugen Ulmer, Stuttgart

**Artigo a ser submetido à revista *Biological Journal of the Linnean Society***

### **3. Reconhecimento inato de plantas hospedeiras por uma abelha oligolética**

Paulo Milet-Pinheiro<sup>1,2\*</sup>, Manfred Ayasse<sup>2</sup>, Clemens Schindwein<sup>3</sup>, Stefan Dötterl<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. (miletpinheiro@hotmail.com)

<sup>2</sup> Instituto de Biologia Experimental, Universidade de Ulm, Alemanha

<sup>3</sup> Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Sistemática Vegetal, Universidade de Bayreuth, Alemanha

### 3.1. Resumo

Abelhas oligoléticas, que restringem a coleta de pólen a plantas relacionadas filogeneticamente, devem reconhecer as suas fontes específicas de pólen e, conseqüentemente, apresentar uma preferência inata pelos sinais florais de suas plantas hospedeiras. Nesse estudo, foi comparada a atratividade de sinais florais visuais e olfativos da planta hospedeira *Campanula trachelium* e das não hospedeiras *Echium vulgare* (Boraginaceae) e *Potentilla recta* (Rosaceae) a abelhas inexperientes de *Chelostoma rapunculi*. Para isso, foram conduzidos seis experimentos de duas escolhas com machos e fêmeas inexperientes de *Ch. rapunculi*, onde sinais visuais e olfativos de flores de *Ca. trachelium* foram testados contra os sinais equivalentes de *E. vulgare* e *P. recta*. Sinais visuais e olfativos de inflorescências de *Ca. trachelium*, isoladamente ou em combinação, foram significativamente mais atrativos para machos e fêmeas inexperientes de *Ch. rapunculi* do que aqueles das plantas não hospedeiras *E. vulgare* e *P. recta*, corroborando as hipóteses levantadas. Os resultados mostram que as abelhas são capazes de reconhecer inatamente as flores de *Ca. trachelium*, utilizando tanto sinais visuais quanto olfativos. No entanto, apesar de sinais visuais serem importantes na localização de plantas hospedeiras, os sinais olfativos, com sua natureza mais complexa, devem ser responsáveis pelo reconhecimento específico. Abelhas oligoléticas *Ch. rapunculi* são providas de adaptações visuais e olfativas, geneticamente determinadas, que direcionam seu forrageio aos sinais florais de suas plantas hospedeiras. Assim, guiadas por essa preferência neurológica inata, essas abelhas localizam e visitam as flores das plantas hospedeiras desde sua emergência. Isso revela que a comunicação químico-olfativa e visual evoluiu nessa associação especializada entre abelhas e flores e é um dos fatores que podem explicar a oligoletia.

**Palavras-chave:** abelhas especialistas, *Campanula*, comportamento de forrageio, *Chelostoma*, *Echium*, gaiola experimental, *Potentilla*, preferência floral, sinais florais.

### 3.2. Introdução

Angiospermas e abelhas evoluíram em uma estreita relação, marcada por um jogo de interesses, no qual as plantas trocam recursos florais pelo serviço da polinização (Jordano, 1987; Bawa, 1990). Nessa interação, o pólen possui um papel chave e conflitante para os parceiros: gameta masculino das angiospermas, ele é também o principal alimento larval das abelhas (Roubik, 1989; Michener, 2007). As larvas possuem um enorme requerimento de pólen e, algumas vezes, a carga polínica de mais de 1000 flores pode ser necessária para suprir uma única larva (Müller *et al.*, 2006). Desta maneira, além de polinizadores, as abelhas são herbívoros vorazes (Westerkamp, 1996). Apesar desse grande requerimento polínico, algumas abelhas restringem a coleta de pólen a plantas de um mesmo gênero ou família para aprovisionar suas crias, fenômeno esse conhecido por oligoetia (Robertson, 1925; Cane & Sipes, 2006).

As flores das angiospermas desenvolveram ao longo de sua história evolutiva uma grande variedade de formas, cores e odores que podem ser utilizadas por abelhas como fonte de informação (Raguso, 2001; Chittka & Raine, 2006). As abelhas apresentam modalidades sensoriais, i.e. visuais, olfativas, táteis e gustativas, capazes de receber e processar esses sinais florais (Kevan & Lane, 1985; Lunau, 1992; 2000; Liu *et al.*, 2004; Chittka & Raine, 2006; Raguso, 2008; 2009; Whitney *et al.*, 2009). Para espécies oligoléticas, encontrar as flores das suas poucas espécies hospedeiras é vital, porque suas larvas não se desenvolvem no pólen de plantas alternativas (Praz, Müller & Dorn, 2008a). Assim, plantas hospedeiras devem ser caracterizadas por sinais florais específicos (Dobson & Bergström, 2000; Dötterl & Vereecken, 2010), e as abelhas adaptadas sensorialmente para reconhecê-los e diferenciá-los dos sinais de outras plantas que ocorrem e florescem simultaneamente na natureza (Sedivy *et al.*, 2008).

Ao emergir de seus ninhos, as abelhas oligoléticas ainda não tiveram contato com flores e, nesse momento, preferências sensoriais inatas, controladas por adaptações geneticamente determinadas, devem direcionar o seu forrageio aos sinais florais de plantas hospedeiras (Praz, Müller & Dorn, 2008b; Sedivy *et al.*, 2008). De uma forma geral, os estudos realizados até o momento sugerem que sinais visuais e olfativos estariam envolvidos no reconhecimento das flores hospedeiras por abelhas oligoléticas (Dobson, 1987; Dobson & Bergström, 2000; Dötterl *et al.*, 2005; Burger, Dötterl & Ayasse, 2008; 2010a; b; Dötterl & Vereecken, 2010). Entre os sinais visuais, a cor das flores parece ser o mais importante na atração das abelhas.

No entanto, a dificuldade das abelhas em diferenciar cores muito semelhantes (Dyer & Chittka, 2004a; b; c), faz das cores uma informação relativamente redundante na natureza. Em contrapartida, o sistema olfativo das abelhas é muito complexo, i.e. na antena de *Apis mellifera* são diferenciados pelo menos 163 receptores (Robertson & Wanner, 2009), o que torna os sinais olfativos uma fonte de informação mais diversificada do que os sinais visuais. Assim, apesar dos sinais visuais serem importantes na atração das abelhas oligoléticas, sinais olfativos específicos devem ser responsáveis pelo reconhecimento das plantas hospedeiras (Dötterl & Vereecken, 2010).

A abelha oligolética *Chelostoma rapunculi* (Lepeletier 1841) (Megachilidae) coleta pólen exclusivamente em flores de *Campanula* para aprovisionar suas células de cria (Westrich, 1989; Schlindwein *et al.*, 2005). No segundo capítulo desta tese, foi mostrado que *Ch. rapunculi* apresenta uma atração inata por sinais florais visuais e olfativos, isoladamente ou em combinação, da planta hospedeira *Campanula trachelium* (Campanulaceae). No entanto, os sinais florais foram testados contra controles vazios. No presente capítulo, sinais florais de plantas hospedeiras foram oferecidos contra aqueles de plantas não hospedeiras. Foram testadas as hipóteses de que tanto machos quanto fêmeas inexperientes de *Ch. rapunculi* apresentam uma preferência inata por: 1) sinais olfativos; 2) sinais visuais e 3) sinais olfativos + visuais da planta hospedeira *Ca. trachelium* em relação aos sinais florais equivalentes das plantas não hospedeiras *Echium vulgare* (Boraginaceae) e *Potentilla recta* (Rosaceae).

### **3.3. Material e Métodos**

#### **3.3.1. A abelha**

*Chelostoma rapunculi* (Lepeletier 1841) é uma abelha solitária univoltina, ativa entre os meses de junho e agosto. Essa espécie, especializada na coleta de pólen em flores de *Campanula*, ocorre por quase toda a Alemanha e nidifica em cavidades pré-existentes de madeira velha e em ninhos-armadilha (Westrich, 1989).

#### **3.3.2. As plantas**

*Campanula trachelium* L é uma erva perene que floresce entre os meses de junho e setembro (Schmeil & Fitschen, 2003). Suas flores hermafroditas, de coloração azul-violeta, são protândricas e auto-incompatíveis e dependem de abelhas para serem polinizadas

(Binnenböse, 1995). O pólen é apresentado secundariamente no estilete coberto por pêlos invagináveis, uma característica típica do gênero *Campanula* (Shetler, 1979).

*Echium vulgare* L. (Boraginaceae) é uma erva perene bianual que floresce entre junho e outubro (Schmeil & Fitschen, 2003). Essa espécie xenogâmica apresenta indivíduos com flores hermafroditas ou femininas (ginodioecia) (Klinkhamer, de Jong & Wesselingh, 1991). Suas flores azuis são dispostas em inflorescências cimosas, polinizadas por abelhas (Klinkhamer *et al.*, 1991; Rademaker, De Jong & Klinkhamer, 1997).

*Potentilla recta* L. (Rosaceae) é uma erva perene que floresce entre junho e julho (Schmeil & Fitschen, 2003). Suas flores amarelas e hermafroditas são auto-incompatíveis e dependem de insetos, principalmente abelhas, para serem polinizadas. (Werner & Soule, 1976; Batra, 1979).

Essas duas últimas espécies ocorrem e florescem simultaneamente com *Ca. trachelium*. Assim, abelhas *Ch. rapunculi* são confrontadas com a opção de visitar flores de uma das três plantas durante a atividade de forrageio no campo.

### 3.3.3. A gaiola experimental

A preferência inata de machos e fêmeas de *Ch. rapunculi* por sinais florais de diferentes plantas, hospedeiras e não hospedeiras, foi estudada entre junho e julho de 2010 em uma gaiola experimental (7,2 x 3,6 x 2,2 m). A gaiola foi construída dentro de uma casa de vegetação (6,5 x 17 m), no Jardim Botânico-Ecológico da Universidade de Bayreuth, Alemanha. As janelas laterais (2 x 15 m<sup>2</sup>) e o teto da casa de vegetação (2 x 20 m<sup>2</sup>) foram abertas, permitindo entrada de luz natural sem ser filtrada pelos vidros. Na gaiola experimental, foram oferecidas às abelhas as condições mais similares possíveis àquelas encontradas na natureza. As abelhas de *Ch. rapunculi* emergiram diretamente na gaiola, a partir de ninhos provisionados em 2009 por uma população de abelhas criadas em condições similares (Milet-Pinheiro *et al.* capítulo 2). Para prevenir qualquer contato das abelhas recém-emergidas com flores das plantas a serem testadas (*Ca. trachelium*, *E. vulgare* e *P. recta*), nenhuma dessas plantas foi disponibilizada na gaiola experimental até que todos os experimentos tivessem sido terminados. Durante este período, foram oferecidas às abelhas água açucarada (30%, frutose e glicose 1:1) em alimentadores artificiais (esponjas) e algumas plantas melíferas (*Geranium pratense* - Geraniaceae, *Lythrum salicaria* - Lythraceae, *Sinapis arvensis* e *Brassica* sp.- Brassicaceae). Ninhos armadilhas, latas cilíndricas preenchidas com ramos de *Phragmites australis* (Poaceae), foram disponibilizados como substratos para nidificação. Nessas condições foi estabelecida uma população de *Ch. rapunculi*, onde os

indivíduos forrageavam em busca de energia (néctar) e copulavam frequentemente. Embora essas abelhas tenham adquirido experiência de forrageio em flores de uma forma geral, elas permaneceram inexperientes em relação às flores de plantas hospedeiras e não hospedeiras a serem testadas.

#### **3.3.4. Experimentos comportamentais**

Para verificar a preferência inata de *Ch. rapunculi* por sinais florais visuais e olfativos (isolados ou em combinação) de diferentes plantas (hospedeiras e não hospedeiras), experimentos de duas escolhas com abelhas inexperientes foram realizados. Inflorescências de plantas hospedeiras (*Ca. trachelium*) e não hospedeiras (*E. vulgare* e *P. recta*) foram encobertas com diferentes cilindros de vidro de quartzo (29 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro) e apresentadas às abelhas, de tal forma que apenas os sinais florais desejados foram oferecidos.

A atração das abelhas por sinais olfativos isoladamente foi testada utilizando-se um cilindro preto com 60 orifícios (diâmetro de 0,2 cm). O cilindro foi pintado com um verniz preto fosco e, durante uma semana, foi deixado em uma estufa a 50° C para eliminar a emissão de cheiro do verniz. O ar no interior do cilindro, enriquecido com os voláteis das inflorescências, foi soprado através dos orifícios por uma bomba de membrana (G12/01 EB, Rietschle Thomas, Puchheim, Alemanha) a um fluxo contínuo de 1 l/min. Para testar a atração das abelhas por sinais visuais isoladamente, inflorescências foram encobertas com um cilindro transparente sem orifícios. Por fim, para testar a atratividade os sinais visuais e olfativos em combinação, inflorescências foram encobertas com um cilindro transparente com 60 orifícios. O ar no interior do cilindro foi soprado como descrito para o cilindro preto.

Experimentos comportamentais de duas escolhas foram realizados na seguinte ordem: 1) Sinais olfativos da planta hospedeira vs. sinais olfativos de plantas não hospedeiras; 2) Sinais visuais da planta hospedeira vs. sinais visuais de plantas não hospedeiras e 3) Sinais visuais + olfativos da planta hospedeira vs. sinais visuais + olfativos de plantas não hospedeiras. Para cada sinal floral testado (isoladamente ou em combinação), inflorescências de *Ca. trachelium* foram oferecidas contra inflorescências de *E. vulgare* ou *P. recta*, totalizando seis experimentos de duas escolhas.

Todos os experimentos foram conduzidos em dias ensolarados entre 10:00 e 15:00 h, horário de maior atividade das abelhas. Cada experimento teve uma duração de 30 min, divididos em duas seções de 15 min, quando a posição dos cilindros foi trocada. Os cilindros foram posicionados a 1,5 m de distância. As respostas das abelhas (vôos em direção ao

cilindro até uma distância de 5 cm ou menos) foram registradas. As abelhas que responderam aos cilindros foram coletadas, marcadas individualmente e armazenadas em uma caixa térmica até o fim do experimento em andamento, quando foram liberadas na gaiola experimental. Dessa forma, um indivíduo participou apenas uma vez em um determinado experimento, mas talvez tenha participado em diferentes experimentos. Devido a fatores estocásticos, tais como morte e eventualmente fuga, o número total de abelhas na gaiola variou entre os experimentos (entre 50 e 100 abelhas).

### **3.3.5. Análise de reflectância e hexágono de cores**

Análises de reflectância foram realizadas para determinar quantitativamente a cor das corolas de *Ca. trachelium*, *E. vulgare* e *P. recta*. Propriedades da reflectância das pétalas (n = 3 para cada espécie), foram determinadas com o espectrofotômetro Varian Cary 5 (Varian, Inc, Palo Alto, CA, EUA), seguindo as técnicas descritas em Chittka & Kevan (2005).

Para avaliar como abelhas de *Ch. rapunculi* percebem as flores, foram determinados os *loci* do estímulo da cor no hexágono de cores (Chittka, 1992), usando o espectro da corola de cada espécie vegetal. Comprimentos de ondas acima de 700 nm foram desconsiderados porque o receptor de vermelho é ausente na maioria das abelhas (Peitsch *et al.*, 1992). A distância entre os *loci* dos estímulos de cor de cada espécie no hexágono foi calculada. Adicionalmente, foi calculada a distância entre o *locus* de cada espécie e o *locus* do ponto não colorido, que é estímulo do *background* com reflectância constante (Chittka *et al.*, 1994). Para isso, foi utilizada a função de reflectância de uma folha verde típica (*background*) e um espectro padrão D65 de irradiância luminosa diurna (Wyszecki & Stiles, 1982).

Como o sistema visual é muito similar para a maioria das abelhas (Peitsch *et al.*, 1992), as funções de sensibilidade de espectros da *Apis mellifera* (Chittka & Kevan, 2005) foram consideradas apropriadas para *Ch. rapunculi*. As cores percebidas pelas abelhas foram categorizadas como UV, UV-azul, azul, azul-verde, verde, UV-verde e não colorido (Chittka *et al.*, 1994). Abelhas são capazes de distinguir cores com distância de pelo menos 0,1 unidades de hexágono (Dyer & Chittka, 2004a).

### **3.3.6. Análises estatísticas**

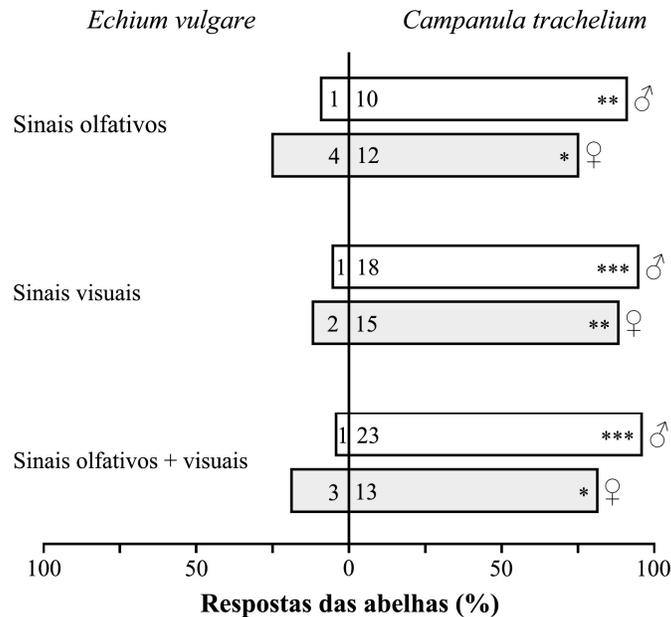
A diferença na reposta das abelhas (machos e fêmeas separadamente) entre os tratamentos pareados em cada experimento comportamental foi verificada a partir do teste de

Qui-quadrado, comparando eventos observados versus esperados. Todos os testes foram realizados com o programa Statistica 7 (StatSoft, 2004).

### 3.4. Resultados

#### 3.4.1. Experimentos comportamentais

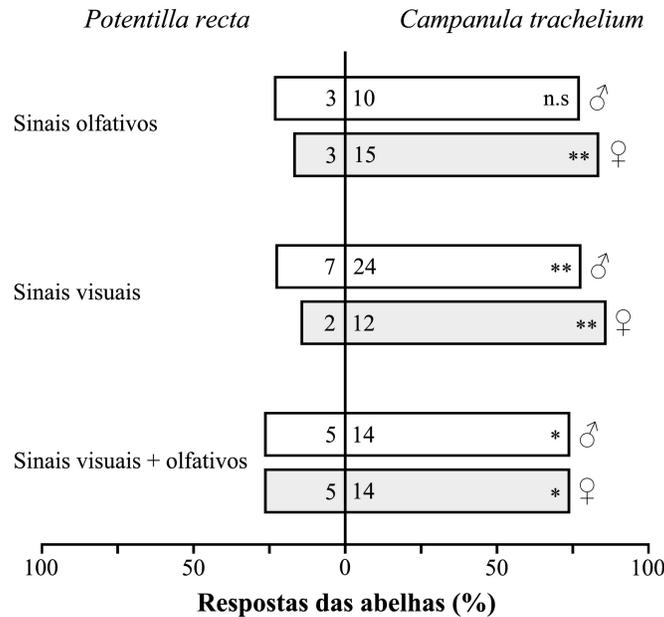
Sinais visuais e olfativos de inflorescências de *Ca. trachelium*, isoladamente ou em combinação, foram significativamente mais atrativos para machos e fêmeas de *Ch. rapunculi* do que aqueles da espécie não hospedeira *E. vulgare* (testes de Qui-quadrado,  $p < 0,05$ ; Fig. 1).



**Fig. 1** Respostas de machos (barras brancas) e fêmeas inexperientes (barras cinzas) de *Chelostoma rapunculi* aos sinais olfativos e visuais (isolados ou em combinação) de inflorescências de *Campanula trachelium* e *Echium vulgare* em experimentos de duas escolhas. Números dentro das barras indicam o número absoluto de respostas das abelhas. A diferença em cada experimento pareado foi verificada a partir do teste de Qui-quadrado, comparando os eventos observados vs. esperados,  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$ (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*)).

Um padrão similar foi observado quando inflorescências de *Ca. trachelium* foram oferecidas contra aquelas da espécie não hospedeiras *P. recta*. Em geral, os sinais florais de *Ca. trachelium* (visuais e olfativos, isolados ou em combinação) também atraíram mais abelhas inexperientes de *Ch. rapunculi* (machos e fêmeas) do que *P. recta* (testes de Qui-quadrado,  $p < 0,05$ ; Fig. 2). No entanto, sinais olfativos de *Ca. trachelium* foram apenas

marginalmente mais atrativos para os machos de *Ch. rapunculi* do que aqueles de *P. recta* ( $p < 0,052$ ).



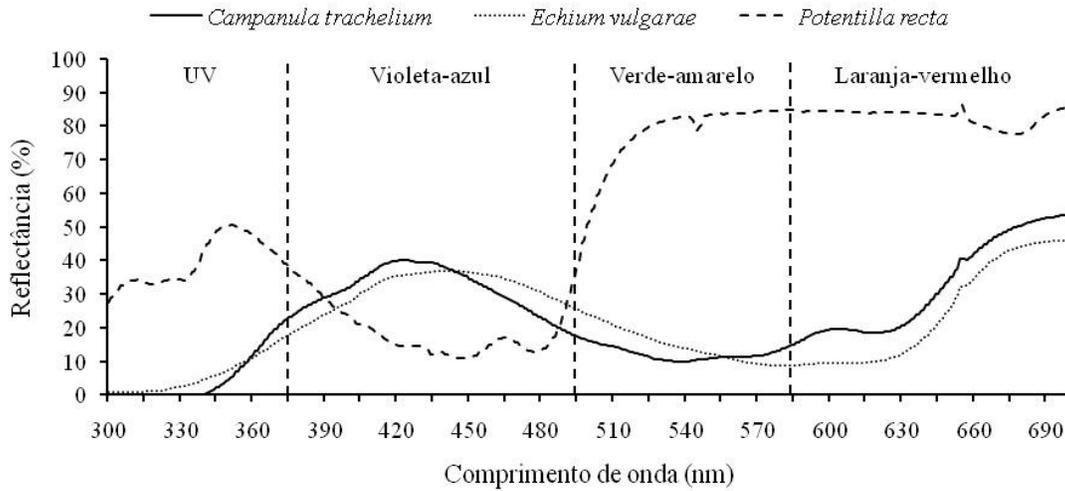
**Fig. 2** Respostas de machos (barras brancas) e fêmeas (barras cinzas) inexperientes de *Chelostoma rapunculi* aos sinais olfativos e visuais (isolados ou em combinação) de inflorescências de *Campanula trachelium* e *Potentilla recta* em experimentos de duas escolhas. Números dentro das barras indicam o número absoluto de respostas das abelhas. A diferença em cada experimento pareado foi verificada a partir do teste de Qui-quadrado, comparando os eventos observados vs. esperados,  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$ (\*\*); n.s. indica diferença não significativa ( $p > 0,05$ ).

Durante toda a fase de experimentos comportamentais, foi observado que, quando plantas hospedeiras estavam ausentes na gaiola, machos e fêmeas de *Ch. rapunculi* forrageavam por néctar em flores das espécies não hospedeiras *Geranium pratense*, *Lythrum salicaria*, *Sinapis arvensis* e *Brassica* sp. e em alimentadores artificiais. Na ausência de pólen das plantas hospedeiras, as fêmeas não iniciaram a atividade de nidificação. Assim que plantas de *Ca. trachelium* foram inseridas na gaiola, machos e fêmeas restringiram o forrageio às suas flores, negligenciando as não hospedeiras. Nesse momento, além de néctar, as fêmeas coletaram pólen em *Ca. trachelium* e iniciaram o provisionamento dos ninhos.

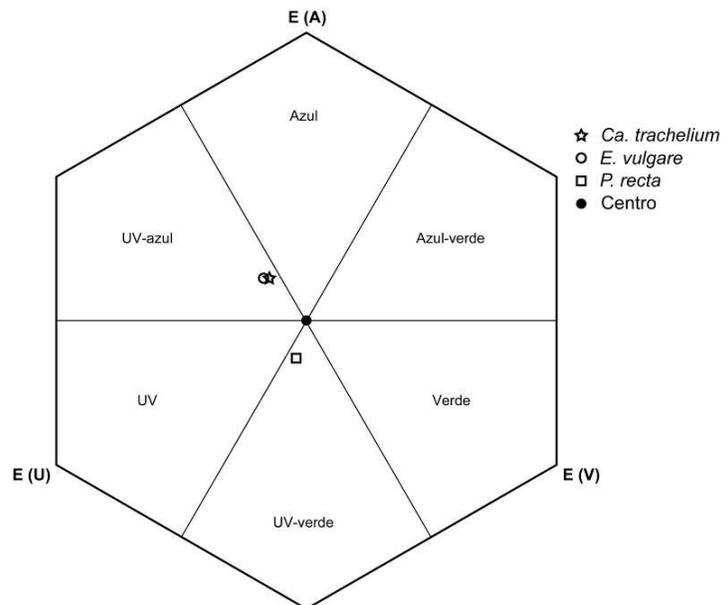
### 3.4.2. Análise de reflectância e hexágono de cores

A corola de *Ca. trachelium* e *E. vulgare* refletiram a luz predominantemente nos comprimentos de onda azul e vermelho. Ambas as espécies refletiram pouca luz ultravioleta. *P. recta* refletiu luz UV fortemente, mas a reflectância do comprimento de onda amarelo e

vermelho foi mais pronunciada (Fig. 3). A análise das cores das corolas no hexágono de cores mostrou que *C. trachelium* e *E. vulgare* são UV-azul para as abelhas e *P. recta* UV-verde (Fig. 4). As distâncias entre o *locus* de *C. trachelium* e aqueles de *E. vulgare* e *P. recta* foram 0,02 e 0,29, respectivamente (Tabela 1).



**Fig.3** Reflectância média (n = 3) das corolas de *Campanula trachelium*, *Echium vulgare* e *Potentilla recta*.



**Fig. 4** Comparação da cor das corolas de *Campanula trachelium*, *Echium vulgare* e *Potentilla recta* no hexágono de cores.

**Tabela 1** Categoria de cores (para a visão das abelhas) e distâncias entre os *loci* de *Campanula trachelium*, *Echium vulgare* e *Potentilla recta* entre si e para o centro no hexágono de cores.

Espécie	Cor para abelha	Distância (unid. de hexágono) entre os <i>loci</i> das cores		
		<i>E. vulgare</i>	<i>P. recta</i>	Centro do hexágono
<i>Campanula trachelium</i>	UV-azul	0,02	0,31	0,21
<i>Echium vulgare</i>	UV-azul		0,30	0,20
<i>Potentilla recta</i>	UV-verde			0,13

### 3.5. Discussão

Os resultados mostram que, mesmo na presença de plantas alternativas, tanto machos quanto fêmeas de *Ch. rapunculi* apresentam uma preferência inata pelos sinais visuais e olfativos, isoladamente ou em combinação, de sua planta hospedeira *Ca. trachelium*. Assim, guiadas por essa preferência neurológica inata, abelhas de *Ch. rapunculi* visitam flores das plantas nas quais são oligoléticas desde sua emergência, o que demonstra a íntima relação entre ambos os parceiros.

#### 3.5.1. Preferência inata de forrageio de *Chelostoma rapunculi*

Recentemente, Sedivy *et al.* (2008) demonstraram que abelhas oligoléticas são providas de adaptações fisiológicas (digestivas) e neurológicas (cognitivas) para explorar os recursos florais de suas plantas hospedeiras. De acordo com os autores, essas adaptações, geneticamente determinadas, estariam limitando a capacidade das abelhas oligoléticas utilizarem pólen de plantas alternativas e, conseqüentemente, conservando o hábito alimentar especializado. Alguns indícios suportam essa hipótese. Estudos experimentais mostraram que a maioria das larvas de abelhas oligoléticas não se desenvolve ou apresenta um crescimento muito limitado em pólen de plantas não hospedeiras (Guirguis & Brindley, 1974; Praz *et al.*, 2008a). Isso deve estar relacionado a limitações das especialistas em digerir grãos de pólen de diferentes grupos vegetais, que apresentam composições protéicas diversificadas (Roulston, Cane & Buchmann, 2000; Roulston & Cane, 2002; Weiner *et al.*, 2010). Curiosamente, a abelha oligolética *Heriades truncorum*, uma das poucas espécies capaz de se desenvolver em fontes polínicas alternativas, preferiu o pólen de suas flores hospedeiras originais (Asteraceae) mesmo que, enquanto larvas, tivessem sido alimentadas com pólen de *Echium vulgare* e *Ca. rotundifolia* (Praz *et al.*, 2008b). Assim, em detrimento da hipótese do

condicionamento aos voláteis de pólen durante o estágio larval (Linsley, 1958), esses autores sugeriram que o reconhecimento inato das flores de plantas hospedeiras teria uma base genética e seria controlado por adaptações neurológicas.

Neste estudo, diversas evidências mostram que *Ch. rapunculi* também apresenta adaptações neurológicas, geneticamente determinadas, relacionadas às flores de *Campanula*: 1) machos e fêmeas inexperientes preferiram sinais visuais e olfativos da planta hospedeira; 2) durante a fase em que plantas hospedeiras não foram oferecidas na gaiola experimental, as fêmeas inexperientes de *Ch. rapunculi* não iniciaram a atividade de nidificação, muito embora elas tivessem visitado flores das não hospedeiras *Geranium pratense*, *Lythrum salicaria*, *Sinapis arvensis* e *Brassica* sp. para tomar néctar; 3) Assim que as plantas de *Ca. trachelium* - hospedeiras de pólen - foram inseridas na gaiola, tanto machos quanto fêmeas restringiram o forrageio por néctar e pólen a essas flores, negligenciando as não hospedeiras; 4) Imediatamente após a retirada das plantas de *Campanula* da gaiola, as fêmeas interrompem o provisionamento de ninhos (Milet-Pinheiro *et al.*, capítulo 2 e 4) e 5) sinais visuais, diferentemente dos olfativos, não podem ser aprendidos durante o estágio larval (Linsley, 1958). Além do mais, nessa espécie, a restrição alimentar é determinada por adaptações fisiológicas, o que impede o desenvolvimento das suas larvas em fontes polínicas alternativas (Praz *et al.*, 2008a). Portanto, essa nítida preferência neurológica por sinais florais de plantas hospedeiras, juntamente com limitações digestivas, restringem a capacidade da abelha oligolética *Ch. rapunculi* utilizar pólen de espécies alternativas e, conseqüentemente, se tornar polilética.

A comparação do comportamento de machos e fêmeas em relação aos sinais florais das plantas hospedeiras evidencia outro aspecto interessante nessa associação. Apesar de machos e fêmeas apresentarem relações diferentes com as flores (Roubik, 1989; Michener, 2007), em *Ch. rapunculi* a preferência inata pelos sinais florais da planta hospedeira foi observada para os dois sexos. Para machos de abelhas, que visitam flores principalmente para coletar néctar, a restrição de forrageio a flores de um mesmo gênero ou família pode parecer uma desvantagem evolutiva. No entanto, em abelhas oligoléticas, a restrição de forrageio às fontes exclusivas de pólen das fêmeas pode significar um maior sucesso reprodutivo para os machos, sem prejudicar a busca por alimento (Oliveira & Schlindwein, 2010). De fato, a patrulha por fêmeas em flores de plantas hospedeiras é uma estratégia reprodutiva bem estabelecida, que já foi observada em machos de diversas espécies oligoléticas (Wittmann *et al.*, 1990; Schlindwein & Wittmann, 1995; Medeiros & Schlindwein, 2003; Schlindwein,

2004; Milet-Pinheiro & Schlindwein, 2010; Oliveira & Schlindwein, 2010; Schlindwein, Pick & Martins, 2010).

### **3.5.2. Sinais visuais e olfativos de flores de *Campanula trachelium*, *Echium vulgare* e *Potentilla recta***

A maior atratividade de sinais visuais e olfativos de *Ca. trachelium* em relação aos de *E. vulgare* e *P. recta* para abelhas de *Ch. rapunculi*, demonstra que essas plantas apresentam sinais florais próprios que podem ser diferenciados pelas abelhas. Visualmente, as abelhas são capazes de distinguir flores de diferentes espécies através do tamanho, da forma, e principalmente, cor (Dafni, Lehrer & Kevan, 1997; Briscoe & Chittka, 2001; Ne'eman & Kevan, 2001; Spaethe, Tautz & Chittka, 2001; Chittka & Raine, 2006). A comparação da cor das corolas no hexágono de cores (Chittka, 1992) mostra que as flores de *Ca. trachelium* e *E. vulgare* são UV-azul para as abelhas e as de *P. recta* UV-verde. Além do mais, a avaliação da distância entre os pontos de cada espécie no hexágono mostra que, utilizando a cor, *Ch. rapunculi* seria capaz de diferenciar as flores de *Ca. trachelium* das de *P. recta*, mas não das de *E. vulgare*. Ainda assim, machos e fêmeas de *Ch. rapunculi* preferiram os sinais visuais de *Ca. trachelium* aos de *E. vulgare*, indicando que uma diferença adicional estaria determinando essa preferência visual.

O fato das flores de *Ca. trachelium* serem bem maiores do que as de *E. vulgare* (Klinkhamer *et al.*, 1991; Binnenböse, 1995), e de flores maiores serem mais facilmente detectadas por abelhas (Spaethe *et al.*, 2001), poderia explicar essa diferença. Por exemplo, para a abelha oligolética *Hoplitis adunca*, sinais visuais da planta hospedeira *E. vulgare* foram igualmente atrativos aos de *Anchusa officinalis*, que tem flores de tamanho e cor similares (Burger *et al.*, 2010b). Isso quer dizer que, sinais visuais de flores, nesse caso a cor, podem ser repetitivos (ver também Nilsson, 1983) e, conseqüentemente, flores hospedeiras devem ser providas de sinais mais específicos que permitam que as abelhas oligoléticas as reconheçam.

Diferentemente de sinais visuais, a composição de odores florais é geralmente espécie-específica (Gregg, 1983; Knudsen & Mori, 1996; Dobson *et al.*, 1997; Knudsen, 1999; Jürgens, Witt & Gottsberger, 2002; Raguso *et al.*, 2003; 2006), o que pode ser utilizado pelas abelhas para distinguir diferentes espécies vegetais (Ayasse, 2006). A preferência de machos e fêmeas inexperientes de *Ch. rapunculi* por sinais olfativos de *Ca. trachelium* em relação aos de *E. vulgare* e *P. recta* não só mostra que a composição de odores florais dessas três espécies é diferente, mas também que as abelhas são capazes de reconhecer suas plantas

hospedeiras, a partir de seus odores. A comparação do buquê de odores florais de *Ca. trachelium* (Milet-Pinheiro *et al.* capítulo 4) e *E. vulgare* (Burger *et al.*, 2010a) evidencia poucos compostos em comum. Infelizmente, os voláteis florais de *P. recta* ainda não foram descritos.

Em síntese, os resultados apresentados sugerem que, apesar de sinais visuais serem importantes na atração de abelhas oligoléticas, os sinais olfativos (odores florais) desempenham um papel crucial, caracterizando especificamente as plantas hospedeiras. Assim, *Ch. rapunculi* deve utilizar composições específicas de odores florais para identificar as flores hospedeiras. Os voláteis florais envolvidos no reconhecimento da planta hospedeira *Ca. trachelium* pelas abelhas oligoléticas *Ch. rapunculi* são discutidos no capítulo 4.

### **3.5.3. A gaiola experimental e o estudo de respostas inatas e adquiridas**

O estudo das respostas comportamentais inatas de abelhas a sinais florais é importante para entender aspectos evolutivos da sua interação com as flores associadas. Na natureza, é praticamente impossível determinar uma resposta inata pelos seguintes motivos: 1) as abelhas, incluindo as oligoléticas, têm uma grande capacidade de aprendizado (Dobson, 1987; Dobson & Bergström, 2000; Chittka, 2002; Dötterl *et al.*, 2005; Leadbeater & Chittka, 2007; Raine & Chittka, 2007; Molet, Chittka & Raine, 2009; Burger *et al.*, 2010b) e, após poucas visitas, o seu comportamento já é influenciado por experiências frustradas ou exitosas em uma determinada fonte floral e 2) a observação de um indivíduo, do momento de sua emergência até sua primeira visita é pouco provável, uma vez que as abelhas voam rapidamente, sem padrão definido. Assim, para estudar respostas comportamentais inatas, a criação de abelhas em gaiolas experimentais, onde as condições são controladas, parece ser a única alternativa. Na gaiola experimental utilizada neste trabalho, populações das abelhas oligoléticas *Macropis fulvipes*, *Hoplitis adunca*, *Chelostoma rapunculi* e *Heriades truncorum* foram estabelecidas exitosamente em 2006, 2007, 2009 e 2010, respectivamente. Entre as grandes vantagens dessa metodologia destacam-se: 1) o grande número de indivíduos disponíveis para os estudos; 2) a possibilidade de acompanhar espécimes individualmente, a partir da marcação; 3) de manter abelhas inexperientes por um longo período de tempo e 4) de manter populações durante vários anos, permitindo o teste de novas hipóteses que surgirem durante a pesquisa. O comportamento natural apresentado por essas abelhas nos diferentes estudos (Dötterl & Schöffler, 2007; Burger *et al.*, 2008; 2010b; Schöffler & Dötterl, 2010) mostra que os resultados adquiridos são robustos e confiáveis, confirmando a

eficiência deste tipo de metodologia na avaliação não apenas de respostas inatas, mas também de comportamentos adquiridos após experiência de forrageio.

### 3.6. Agradecimentos

Nós agradecemos Hannah Burger e Irmgard Schäffler pelo suporte metodológico e discussões construtivas, Hans-Joachim Flügel (Lebendiges Bienenmuseum Knüllwald) e Jochen Fründ (Universidade de Göttingen, Alemanha) por cederem gentilmente ninhos de *Chelostoma rapunculi*. Bolsas foram providas a PM-P (DAAD/CAPES/CNPq) e CS (CNPq/CAPES).

### 3.7. Literatura citada

- Ayasse M. 2006.** Floral scent and pollinator attraction in sexually deceptive orchids. In: Dudareva N, Pichersky E, eds. *Biology of Floral Scent*. Boca Raton: CRC Press, 219-242.
- Batra SWT. 1979.** Insects associated with weeds in the northeastern United States. II. Cinquefoils, *Potentilla norvegica* and *P. recta* (Rosaceae). *New York Entomological Society* **87**: 216-222.
- Bawa KS. 1990.** Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**: 399-422.
- Binnenböse S. 1995.** Blüten- und Reproduktionsbiologie von *Campanula*. Não publicado. Monografia, Universität Ulm.
- Briscoe AD, Chittka L. 2001.** The evolution of color vision in insects. *Annual Review of Entomology* **46**: 471-510.
- 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.
- Burger H, Dötterl S, Ayasse M. 2008.** Importance of olfactory and visual cues of *Echium* for host-plant finding of the oligolectic bee *Osmia adunca* (Megachilidae). *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie* **16**: 163-166.

- Cane JH, Sipes S. 2006.** Characterizing floral specialization by bees: analytical methods and revised lexicon for oligolecty. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. Chicago: The University of Chicago Press, 99-121.
- Chittka L. 1992.** The colour hexagon: a chromaticity diagram based on photoreceptor excitations as a generalized representation of colour opponency. *Journal of Comparative Physiology A* **170**: 533-543.
- Chittka L. 2002.** Influence of intermittent rewards in learning to handle flowers in bumblebees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus impatiens*). *Entomologia Generalis* **26**: 85-91.
- Chittka L, Kevan PG. 2005.** Flower colour as advertisement. In: Dafni A, Kevan PG, Husband BC, eds. *Practical Pollination Biology*. Cambridge: Enviroquest Ltd, 157 - 196.
- Chittka L, Raine NE. 2006.** Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 428-435.
- Chittka L, Shmida A, Troje N, Menzel R. 1994.** Ultraviolet as a component of flower reflections, and the colour perception of Hymenoptera. *Vision Research* **34**: 1489-1508.
- Dafni A, Lehrer M, Kevan PG. 1997.** Spatial flower parameters and insect spatial vision. *Biological Review* **72**: 239-282.
- Dobson HEM. 1987.** Role of flower and pollen aromas in host-plant recognition by solitary bees. *Oecologia* **72**: 618-623.
- Dobson HEM, Arroyo J, Bergström G, Groth I. 1997.** Interspecific variation in floral fragrances within the genus *Narcissus* (Amaryllidaceae). *Biochemistry Systematics and Evolution* **25**: 685-706.
- Dobson HEM, Bergström G. 2000.** The ecology of pollen odors. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 63-87.
- 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, Schäßler 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 JN. 2010.** The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: a review and perspectives. *Canadian Journal of Zoology* **88**: 668-697.
- Dyer AG, Chittka L. 2004a.** Biological significance of distinguishing between similar colours in spectrally variable illumination: Bumblebees (*Bombus terrestris*) as a case study. *Journal of Comparative Physiology A* **190**: 105-114.
- Dyer AG, Chittka L. 2004b.** Bumblebee search time without ultraviolet light. *The Journal of Experimental Biology* **207**: 1683-1688.
- Dyer AG, Chittka L. 2004c.** Fine colour discrimination requires differential conditioning in bumblebees. *Naturwissenschaften* **91**: 224-227.
- Gregg KB. 1983.** Variation in floral fragrances and morphology: incipient speciation in *Cynoches*? *Botanical Gazette* **144**: 566-576.
- Guirguis GN, Brindley WA. 1974.** Insecticide susceptibility and response to selected pollens of larval alfalfa leafcutting bees, *Megachile pacifica* (Panzer) (Hymenoptera: Megachilidae). *Environmental Entomology* **3**: 691-694.
- Jordano P. 1987.** Patterns of mutualistic interactions in pollination and seed dispersal: connectance, dependence asymmetries, and coevolution. *American Naturalist* **129**: 657-677.
- Jürgens A, Dötterl S, Meve U. 2006.** The chemical nature of fetid floral odours in Stapeliads (Apocynaceae-Asclepiadoideae-Ceropegieae). *The New Phytologist* **172**: 452-468.
- Jürgens A, Witt T, Gottsberger G. 2002.** Flower scent composition in night-flowering *Silene* species (Caryophyllaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **30**: 383-397.
- Kevan PG, Lane MA. 1985.** Flower petal microtexture is a tactile cue for bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 4750-4752.
- Klinkhamer PGL, de Jong TJ, Wesselingh EA. 1991.** Implications of differences between hermaphrodite and female flowers for attractiveness to pollinators and seed production. *Netherlands Journal of Zoology* **41**: 130-143.
- Knudsen JT. 1999.** Floral scent chemistry in geonomoid palms (Palmae: Geonomeae) and its importance in maintaining reproductive isolation. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **83**: 141-168.
- Knudsen JT, Mori SA. 1996.** Floral scents and pollination in Neotropical Lecythidaceae. *Biotropica* **28**: 42-60.

- Leadbeater E, Chittka L. 2007.** Social learning in insects - from miniature brains to consensus building. *Current Biology* **17**: 703-713.
- Linsley EG. 1958.** The ecology of solitary bees. *Hilgardia* **27**: 543-599.
- Liu FL, Fu WJ, Yang DR, Peng YQ, Zhang XW, He JZ. 2004.** Reinforcement of bee-plant interaction by phenolics in food. *Journal of Apicultural Research* **43**: 155-157.
- Lunau K. 1992.** Innate recognition of flowers by bumble bees: Orientation of antennae to visual stamen signals. *Canadian Journal of Zoology* **70**: 2139-2144.
- Lunau K. 2000.** The ecology and evolution of visual pollen signals. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 89-111.
- Medeiros PCR, Schlindwein C. 2003.** Territórios de machos, acasalamento, distribuição e relação com plantas em *Protomelitura turnerae* (Ducke, 1907) (Hymenoptera, Andrenidae). *Revista Brasileira de Entomologia* **47**: 589-596.
- Michener CD. 2007.** *The bees of the world*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.
- Milet-Pinheiro P, Schlindwein 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.
- Molet M, Chittka L, Raine NE. 2009.** How floral odours are learned inside the bumblebee (*Bombus terrestris*) nest. *Naturwissenschaften* **96**: 213-219.
- Müller A, Diener S, Schnyder S, Stutz K, Sedivy C, Dorn S. 2006.** Quantitative pollen requirements of solitary bees: implications for bee conservation and the evolution of bee-flower relationships. *Biological Conservation* **130**: 604-615.
- Ne'eman G, Kevan PG. 2001.** The effect of shape parameters on maximal detection distance of model targets by honeybee workers. *Journal of Comparative Physiology A* **187**: 653-660.
- Nilsson LA. 1983.** Mimesis of Bellflower *Campanula* by the Red Helleborine Orchid *Cephalanthera-Rubra*. *Nature* **305**: 799-800.
- Oliveira R, Schlindwein C. 2010.** Experimental demonstration of alternative mating tactics of male *Ptilothrix fructifera* (Hymenoptera, Apidae). *Animal Behaviour*: doi:10.1016/j.anbehav.2010.1004.1024.
- Peitsch D, Fietz A, Hertel H, de Souza J, Ventura DF, Menzel R. 1992.** The Spectral Input Systems of Hymenopteran Insects and Their Receptor-Based Colour Vision. *Journal of Comparative Physiology A Sensory Neural & Behavioral Physiology* **170**: 23-40.

- 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.
- Rademaker MCJ, De Jong TJ, Klinkhamer PGL. 1997.** Pollen dynamics of bumble-bee visitation on *Echium vulgare*. *Functional Ecology* **11**: 554-563.
- Raguso RA. 2001.** Floral scent, olfaction, and scent-driven foraging behavior. In: Chittka L, Thomson JD, eds. *Cognitive Ecology of Pollination* Cambridge: Cambridge University Press, 83–105.
- Raguso RA. 2008.** Start making scents: the challenge of integrating chemistry into pollination ecology. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **128**: 196-207.
- Raguso RA. 2009.** Floral scent in a whole-plant context: moving beyond pollinator attraction. *Functional Ecology* **23**: 837–840.
- Raguso RA, Levin RA, Foose SE, Holmberg MW, McDade LA. 2003.** Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes” in *Nicotiana*. *Phytochemistry* **63**: 265–284.
- Raine NE, Chittka L. 2007.** Pollen foraging: learning a complex motor skill by bumblebees (*Bombus terrestris*). *Naturwissenschaften* **94**: 459-464.
- Robertson C. 1925.** Heterotropic bees. *Ecology* **6**: 412-436.
- Robertson HM, Wanner KW. 2009.** The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: Expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Research* **16**: 1395-1403.
- Roubik DW. 1989.** *Ecology and natural history of tropical bees*. New York: Cambridge University Press.
- Roulston TH, Cane JH. 2002.** The effect of pollen protein concentration on body size in the sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Apiformes). *Evolutionary Ecology* **16**: 49-65.
- Roulston TH, Cane JH, Buchmann SL. 2000.** What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny? *Ecological Monographs* **70**: 617-643.
- Schäffler I, Dötterl S. 2010.** Phenology, nesting & foraging behavior of an oil bee. *Apidologie*. in Press.

- Schindwein C. 2004.** Are oligolectic bees always the most effective pollinators? In: Magalhães FB, Pereira JOP, eds. *Solitary bees - Conservation, rearing and management for pollination*. Fortaleza: Imprensa Universitária UFCE, 231-240.
- Schindwein C, Pick RA, Martins CF. 2010.** Evaluation of oligolecty in the Brazilian bee *Ptilothrix plumata* (Hymenoptera, Apidae, Emphorini). *Apidologie* **40**: 106–116.
- Schindwein C, Wittmann D. 1995.** Specialized solitary bees as effective pollinators of South Brazilian species of *Notocactus* and *Gymnocalycium* (Cactaceae). *Bradleya* **13**: 25-34.
- Schindwein 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.
- Schmeil O, Fitschen J. 2003.** *Flora von Deutschland und angrenzender länder*. Stuttgart: Quelle + Meyer.
- 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.
- Shetler SG. 1979.** Pollen-collecting hairs of *Campanula* (Campanulaceae), I: Historical review. *Taxon* **28**: 205-215.
- Spaethe J, Tautz J, Chittka L. 2001.** Visual constraints in foraging bumblebees: flower size and color affect search time and flight behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 3898–3903.
- StatSoft I. 2004.** STATISTICA (data analysis software system). version 7. www.statsoft.com ed.
- Weiner CN, Hilpert A, Werner M, Linsenmair KE, Blüthgen N. 2010.** Pollen amino acids and flower specialisation in solitary bees. *Apidologie* **41**: 476–487.
- Werner PA, Soule JD. 1976.** The biology of Canadian Weeds. 18. *Potentilla recta* L. *P. norvegica* L., and *P. argentea* L. *Canadian Journal of Plant Science* **56**: 591-603.
- Westerkamp C. 1996.** Pollen in bee-flower relations, some considerations on melittophily. *Botanica Acta* **109**: 325-332.
- Westrich P. 1989.** *Die Wildbienen Baden-Württembergs: Spezieller Teil: Die Gattungen und Arten*. Stuttgart: Eugen Ulmer.

- Whitney HM, Chittka L, Bruce TJA, Glover BJ. 2009.** Conical epidermal cells allow bees to grip flowers and increase foraging efficiency. *Current Biology* **19**: 948-953.
- Wittmann D, Radtke R, Cure JR, Schifino-Wittmann MT. 1990.** Coevolved reproductive strategies in the oligolectic bee *Callonychium petuniae* (Apoidea, Andrenidae) and three purple flowered *Petunia* species (Solanaceae) in southern Brazil. *Zeitschrift für zoologische Systematik und Evolutionsforschung* **28**: 157-165.
- Wysecki G, Stiles WS. 1982.** *Color science: concepts and methods, quantitative data and formulae*. New York: Wiley.

**Manuscrito a ser submetido à revista *Functional Ecology***

#### **4. Espiroacetais: a chave para o reconhecimento de plantas hospedeiras por uma abelha oligolética**

Autores: Paulo Milet-Pinheiro<sup>1\*</sup>, Stefan Dötterl<sup>2</sup>, Clemens Schlindwein<sup>3</sup>, Heidi E. M. Dobson<sup>4</sup>, Wittko Francke<sup>5</sup> e Manfred Ayasse<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. (miletpinheiro@hotmail.com)

<sup>2</sup> Departamento de Sistemática Vegetal, Universidade de Bayreuth, Alemanha

<sup>3</sup> Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Biologia, Whitman College, Walla Walla, WA, USA

<sup>5</sup> Instituto de Química Orgânica, Universidade de Hamburg, Alemanha

<sup>6</sup> Instituto de Biologia Experimental, Universidade de Ulm, Alemanha

#### 4.1. Resumo

Abelhas oligoléticas coletam pólen em plantas de um ou mais gêneros da mesma família para alimentar suas larvas. Conseqüentemente, essas abelhas devem utilizar “marcadores” florais específicos para reconhecer as plantas hospedeiras. No entanto, os sinais florais específicos envolvidos nesse reconhecimento ainda são pouco conhecidos. O objetivo desse estudo foi investigar quais voláteis florais abelhas oligoléticas *Chelostoma rapunculi* utilizam para reconhecer plantas hospedeiras de *Campanula trachelium*. A partir de técnicas de cromatografia gasosa acoplada à detecção eletroantegráfica (GC-EAD), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e da realização de experimentos comportamentais com substâncias eletrofisiologicamente ativas, foram identificados os voláteis florais de *Ca. trachelium* responsáveis pela atração de *Ch. rapunculi*. As flores de *Ca. trachelium* emitiram 59 compostos voláteis, mas apenas dez respostas fisiológicas foram registradas na antena das abelhas. Nos experimentos comportamentais, as abelhas inexperientes de *Ch. rapunculi* responderam apenas às misturas sintéticas com todos os compostos eletrofisiologicamente ativos ou à mistura de espiroacetais. Após experiência de forrageio nas flores hospedeiras, as abelhas também responderam àquelas misturas de benzenóides, terpenos e alifáticos. Além do mais, a mistura de espiroacetais foi tão atrativa quanto inflorescências de *Ca. trachelium* para abelhas inexperientes, o que não aconteceu para abelhas experientes. Em síntese, os resultados mostram que abelhas inexperientes de *Ch. rapunculi* utilizam voláteis florais raros (espiroacetais) para reconhecer plantas hospedeiras de *Ca. trachelium* e que após experiência o padrão inato de forrageio das abelhas é alterado.

**Palavras chave:** abelhas oligoléticas, *Chelostoma*, *Campanula*, cromatografia gasosa acoplada à detecção eletroantegráfica (GC-EAD), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), reconhecimento floral, espiroacetais, voláteis florais.

## 4.2. Introdução

As abelhas utilizam sinais florais como cor, tamanho, e odores para encontrar e selecionar suas fontes de alimento (Lunau 1995; Dobson & Bergström 2000; Chittka & Raine 2006). As plantas produzem um grande número de voláteis florais, em buques complexos, que podem ser utilizados pelas abelhas tanto para discriminar diferentes espécies vegetais, quanto para avaliar a disponibilidade de recurso (e.g. néctar e pólen) nas flores (Dobson, Bergström & Groth 1990; Bergström, Dobson & Groth 1995; Dobson, Groth & Bergström 1996; Dobson, Danielson & Van Wesep 1999; Ayasse *et al.* 2000; Dobson & Bergström 2000; Howell & Alarcón 2007; Burger *et al.* 2010). Em associações especializadas, como aquelas entre abelhas oligoléticas e suas plantas hospedeiras, acredita-se que os voláteis florais desempenham um papel chave no reconhecimento das fontes exclusivas de pólen (Dobson & Bergström 2000; Dötterl & Vereecken 2010).

Abelhas oligoléticas restringem a coleta de pólen a plantas de um mesmo gênero ou família para aprovisionar suas larvas (Robertson 1925; Cane & Sipes 2006; Müller & Kuhlmann 2008). Assim, plantas hospedeiras devem ser providas de marcadores florais específicos que permitam que as abelhas as reconheçam, e recentes evidências mostraram que perfumes florais desempenhariam essa função. A primeira evidência experimental que abelhas oligoléticas utilizariam perfumes florais para diferenciar plantas hospedeiras de não hospedeiras foi encontrada por Dobson (1987). Em experimentos comportamentais, abelhas inexperientes da espécie ecleticamente oligolética *Colletes fulgidus longiplumosus* (Colletidae) preferiram os odores florais de sua principal planta hospedeira *Grindelia stricta* (Asteraceae) em relação àqueles de plantas não hospedeiras. No entanto, nesses experimentos, os voláteis florais envolvidos no reconhecimento das plantas hospedeiras não foram investigados.

O papel de compostos florais individuais no reconhecimento de plantas hospedeiras por abelhas oligoléticas foi investigado em poucos sistemas. Dobson & Bergström (2000), por exemplo, mostraram que abelhas inexperientes de *Chelostoma florissomne* (Megachilidae) utilizam protoanemonina, um composto floral raro, para encontrar flores hospedeiras de *Ranunculus* (Ranunculaceae). Já Dötterl *et al.* (2005), utilizando técnicas de cromatografia gasosa acoplada à detecção eletroantegráfica (GC-EAD), identificaram 16 compostos florais em duas espécies de *Salix* (11 compostos encontrados em ambas as espécies), ativos nas antenas da abelha oligolética *Andrena vaga* (Andrenidae). A atividade comportamental

de 1,4-dimetoxibenzeno, salicilato de metila, (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, e 2-feniletanol (isoladamente ou em mistura) em *A. vaga* foi confirmada em bioensaios com abelhas forrageando no campo (Dötterl & Vereecken 2010). Finalmente, Andrews *et al.* (2007) mostraram que os compostos florais comuns 1,2,4-trimetoxibenzeno e (*E*)-cinamaldeído de *Cucurbita moschata* (Cucurbitaceae) atraem fêmeas de *Peponapis pruinosa* (Apidae), uma abelha oligolética em pólen de *Cucurbita*.

De uma maneira geral, esses estudos avaliaram o papel de voláteis florais individuais na atração de abelhas oligoléticas. No entanto, em nenhum estudo foram identificados marcadores químicos específicos das plantas hospedeiras, que poderiam ser utilizados pelas abelhas oligoléticas como chave para o reconhecimento. Por exemplo, os compostos identificados como responsáveis pela atração das abelhas oligoléticas *C. florissomne*, *A. vaga* e *P. pruinosa* ou são compostos comuns registrados em perfumes florais de diversas espécies vegetais ou são compostos incomuns, mas, ainda assim, não exclusivos das plantas hospedeiras (Knudsen *et al.* 2006). Além do mais, alguns dos compostos ativos encontrados em *Salix caprea* e *S. atrocinerea* não foram registrados em outras espécies de *Salix*, também visitadas por *A. vaga* (Dötterl *et al.* 2005; Dötterl & Vereecken 2010). No presente cenário, o exato meio no qual as abelhas oligoléticas encontram suas flores hospedeiras ainda é desconhecido. Mesmo assim, existem alguns indícios de que as abelhas oligoléticas reconheceriam suas plantas hospedeiras a partir de compostos florais altamente específicos, o que ainda precisa ser testado experimentalmente (Dobson & Bergström 2000; Dötterl *et al.* 2005; Burger *et al.* 2010; Dötterl & Vereecken 2010).

*Chelostoma rapunculi* (Lepeletier 1841) é uma abelha estreitamente oligolética que coleta pólen exclusivamente em espécies de *Campanula* (Westrich 1989). Recentemente, um estudo experimental mostrou que abelhas inexperientes de *Ch. rapunculi* apresentam uma atração inata pelos sinais florais visuais e olfativos (isoladamente ou em combinação) da planta hospedeira *Ca. trachelium* (Milet-Pinheiro *et al.* capítulo 2). Além do mais, essas abelhas preferem os sinais florais de suas plantas hospedeiras do que aqueles de plantas não hospedeiras como *Echium vulgare* (Boraginaceae) e *Potentilla recta* (Rosaceae) (Milet-Pinheiro *et al.* capítulo 3). Assim, *Ca. trachelium* deve apresentar características florais próprias (i.e. odores florais) que permitam que as abelhas as diferenciem de outras plantas. No entanto, os voláteis florais emitidos por esta planta e envolvidos na atração dessas abelhas ainda são desconhecidos.

O objetivo do presente estudo foi identificar os voláteis florais de *Ca. trachelium* e avaliar sua função para as abelhas oligoléticas *Ch. rapunculi*, para responder as seguintes perguntas: 1) Quais os compostos florais de *Ca. trachelium* atraem abelhas de *Ch. rapunculi*? 2) As flores de *Ca. trachelium* emitem compostos florais raros? e 3) A experiência com flores altera o padrão químico inato de forrageio das abelhas? Esse trabalho testou a hipótese de que abelhas *Ch. rapunculi* reconhecem suas plantas hospedeiras *Ca. trachelium* a partir de compostos florais altamente específicos.

### **4.3. Material e métodos**

#### ***4.3.1. Amostra de voláteis florais***

Voláteis florais foram amostrados a partir de inflorescências de *Ca. trachelium*, utilizando as técnicas de *headspace* dinâmico (Dötterl, Wolfe & Jürgens 2005). As plantas foram cultivadas na casa de vegetação do Departamento de Sistemática Vegetal, Universidade de Bayreuth, Alemanha. Inflorescências de três indivíduos, com aproximadamente 80 flores ao todo, foram envolvidas com sacos de poliéster (Toppits®). Os voláteis das inflorescências foram, então, acumulados durante 30 min. Após isso, o ar, enriquecido com voláteis florais, foi sugado durante 4 h através de filtros adsorventes com o auxílio de uma bomba de membrana (G12/01 EB, Rietschle Thomas, Puchheim, Alemanha). A bomba operou com um fluxo de ar de 200 ml/min. Os tubos adsorventes são microtubos de quartzo (ChromatoProbe, Varian Inc.), com 15 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, cortado na extremidade fechada e preenchido com uma mistura de 1,5 mg Tenax-TA (mesh 60-80, Supelco) e 1,5 mg de Carbotrap (mesh 20-40, Supelco). A mistura foi fixada nos tubos utilizando-se lã de vidro (Dötterl & Jürgens 2005).

Adicionalmente, amostras em solvente também foram coletadas. Para isso, foram utilizados tubos de vidro preenchidos com 20 mg da mesma mistura. O método foi o mesmo como descrito acima, com a exceção de que os voláteis foram coletados durante um período de 8 h (das 10:00 às 18:00 h), com um fluxo de ar de 100 ml/min. Os voláteis retidos nos tubos adsorventes foram lavados com 80 µl de acetona (99.8%, Merck).

Para detectar compostos não oriundos de flores (partes vegetativas) e contaminantes do ambiente, amostras de *headspace* das folhas (plantas pré-floração envolvidas por sacos de forno) e controles brancos (sacos vazios) foram coletadas utilizando os dois tipos de tubos adsorventes, seguindo os mesmos métodos já descritos anteriormente. Todas as amostras de *headspace* coletadas (nos tubos adsorventes e em solvente) foram armazenados

individualmente em frascos de vidro (2 ml) a -20°C, até as análises de GC-EAD ou GC-MS, ambos equipados com um injetor para dessorção térmica (ver abaixo).

#### **4.3.2. Eletrofisiologia**

Análises eletrofisiológicas (GC-EAD) das amostras de *headspace* de *Ca. trachelium* foram realizadas em um cromatógrafo gasoso (HP 5890 Series 2, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), equipado com um FID e uma interface de EAD, provida pela Syntech (Kirchzarten, Alemanha), o mesmo sistema descrito por Dötterl *et al.* (2005). Amostras de *headspace* (nos microtubos de quartzo ou 1 µl das amostras em solvente) foram injetadas, utilizando uma sonda de cromatografia (ChromatoProbe, AvivAnalytical, Hod Hasharon, Israel) anexada ao injetor. A temperatura inicial do forno do GC foi de 60° C e a temperatura do injetor 220° C. A válvula do divisor foi então aberta após 1 min e a temperatura do forno aumentada a uma taxa de 10° C/min até atingir 220° C. Essa temperatura final foi mantida por 5 min. Uma coluna ZB-5 foi utilizada para as análises (30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e uma espessura de filme de 0,25 mm, Phenomenex). O efluente foi dividido [utilizando um divisor de quatro vias (GRAPHPACK 3D/2, Gerstel, Mülheim, Alemanha)] e 16 ml/min de gás de arraste (Hélio) foi adicionado. A saída do EAD foi colocada em um fluxo de ar estéril e umidificado, direcionado diretamente à antena da abelha. Antenas de fêmeas recém-emergidas de *Ch. rapunculi* (n = 6) foram testadas. Para as análises, as antenas foram cortadas em ambas as extremidades e montadas entre dois eletrodos. Os eletrodos foram preenchidos com solução fisiológica de insetos (8,0 g/l NaCl, 0,4 g/l KCl, 0,4 g/l CaCl<sub>2</sub>) e conectados a fios de prata. Compostos foram considerados eletrofisiologicamente ativos quando estimularam respostas na antena de pelo menos três indivíduos.

#### **4.3.3. Análises químicas**

Com o objetivo de identificar os voláteis florais de *Ca. trachelium*, incluindo aqueles que estimularam respostas na antena das abelhas, amostras de *headspace* foram analisadas em um espectrômetro de massa (Varian Saturn 2000) acoplado a um cromatógrafo gasoso (Varian 3800). O GC foi equipado com um injetor 1079 (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), que foi adaptado com um kit ChromatoProbe (veja Dötterl & Jürgens 2005). Um microtubo de quartzo ou 1 µl das amostras em solvente foi injetado na sonda do kit, a qual foi então inserida no injetor adaptado do GC. Para excluir qualquer resto de ar no sistema, a divisão do injetor foi aberta e o injetor foi então aquecido até 40° C. Após 2 min, a abertura do divisor foi fechada e o injetor aquecido até 200° C, temperatura esta mantida por 4,2 min. O divisor

foi, então, reaberto e o injetor arrefecido. Uma coluna ZB-5 (5% fenil polisiloxano) foi utilizada para as análises (60 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm, e uma espessura do filme de 0,25 µm, Phenomenex). Um controle eletrônico do fluxo foi utilizado para manter um fluxo constante do gás de arraste Hélio, a 1,8 ml/min. A temperatura do forno do GC foi mantida por 7 min a 40° C, com um acréscimo de 6° C/min até a temperatura final 250° C, mantida por 1 min. A interface do MS operou a 260° C e a armadilha de íons a 175° C. Os espectros de massa ( $m/z$  30 a 350) foram registrados a 70 eV (no modo EI) com uma velocidade de digitalização de 1 scan  $s^{-1}$ . Os dados do GC-MS foram processados utilizando o pacote do programa Varian Saturn (versão 5.2.1).

Para determinar a quantidade absoluta de cada composto floral nas amostras de inflorescências de *Ca. trachelium*, quantidades conhecidas de monoterpenos, derivados de ácidos graxos e benzenóides foram injetadas no GC-MS. A resposta média desses compostos (área média dos picos) foi utilizada para determinar a relação entre área e quantidade absoluta de cada composto (Para mais detalhes ver Dötterl *et al.* 2005). Seis amostras de *headspace* de *Ca. trachelium* foram analisadas utilizando o pacote do programa Varian Saturn (versão 5.2.1), e a quantidade total (absoluta) e percentual de cada composto nas amostras foi determinada. Para excluir compostos presentes em folhas e outras partes vegetativas das amostras de inflorescências, amostras de *headspace* de plantas em floração e plantas sem flores (apenas folhas e outras partes vegetativas) foram comparadas. Contaminantes do ambiente foram excluídos das análises.

#### **4.3.4. Preparação de misturas sintéticas**

Para verificar se os compostos que estimularam a antena das abelhas também estimulariam respostas comportamentais em abelhas *Ch. rapunculi*, foi preparada uma mistura contendo todos os compostos ativos eletrofisiologicamente. Com a exceção de espiroacetais, que foram sintetizadas, terpinoleno (97%) e  $\alpha$ -copaeno (97%), disponíveis, respectivamente, no acervo do departamento de química orgânica (Universidade de Bayreuth) e do Instituto de Ecologia Experimental (Universidade de Ulm), os compostos foram comprados de fornecedores comerciais: geranilacetona (mistura de isômeros, >97%), linalol (97%), salicilato de metila (>98%),  $\beta$ -ocimeno (mistura de isômeros, 90%), fenilacetaldeído (99%), 2-feniletacetato (99%), e 2-feniletanol (99%) da empresa Sigma-Aldrich; furanóide, óxido de linalol (mistura de isômeros,  $\geq$ 97%) e 2-nonanona ( $\geq$ 97%) da Fulka e guaiacol (>98%) da Merck. Adicionalmente, para verificar o papel de cada classe de compostos na atração das abelhas, foram preparadas quatro misturas contendo os compostos ativos

eletrofisiologicamente das seguintes classes: 1) alifáticos; 2) benzenóides; 3) espiroacetais; 4) terpenos.

Em todas as misturas, a quantidade absoluta de cada compostos sintéticos foi equivalente àquela encontrada nas amostras de *headspace* das inflorescências de *Ca. trachelium*. Uma vez que cada substância apresenta uma taxa de evaporação diferente, uma mistura sintética foi preparada, com 10 µl de cada substância ativa eletrofisiologicamente a  $10^{-4}$  em acetona. 10 µl dessa mistura foi gotejada em um papel filtro (2 cm<sup>2</sup>) e uma amostra de *headspace* dinâmico foi coletada com microtubo adsorventes de quartzo (veja métodos na seção análises químicas). Os voláteis foram coletados durante 30 min, tempo esse equivalente àquele em que os experimentos comportamentais foram realizados. A amostra foi, então, quantificada em análises de GC-MS e a quantidade absoluta de cada composto foi calculada (ver métodos na seção análises químicas). Baseado na quantidade de substâncias sintéticas nessa amostra, uma nova mistura foi calibrada, de tal forma que a quantidade absoluta de cada composto estivesse entre as quantidades absolutas máximas e mínimas encontrada nas amostras de *headspace* das inflorescências de *Ca. trachelium*. A quantidade absoluta de cada composto encontrada em 10 µl dessas misturas foi equivalente àquela encontrada em cerca de 80 flores de *Ca. trachelium*. Considerando que *Ca. trachelium* vegeta áreas abertas, onde vários indivíduos ocorrem simultaneamente, e que um único indivíduo pode ter mais de 30 flores, a concentração das misturas sintéticas reflete bem as condições naturais nas quais abelhas *Ch. rapunculi* são confrontadas durante a atividade de forrageio.

#### **4.3.5. Experimentos comportamentais**

Do início de junho ao fim de julho de 2010, a atratividade de compostos ativos eletrofisiologicamente foi testada a partir de experimentos comportamentais com abelhas inexperientes e experientes de *Ch. rapunculi* em uma gaiola experimental (7,2 x 3,6 x 2,2m), a mesma utilizada por Dötterl e Schäffler (2007). As abelhas emergiram diretamente na gaiola, onde ninhos tinham sido provisionados um ano antes. Para manter a população da abelha dentro da gaiola, foram providos substratos artificiais para nidificação (ninhos armadilha; latas cilíndricas preenchidas com ramos cortados de *Phragmites australis*), alimentadores artificiais (esponjas embebidas com água açucarada) e plantas melíferas não hospedeiras (*Geranium pratense*, *Lythrum salicaria* e *Sinapis arvensis*). Com essa metodologia, foi garantido que as abelhas permanecessem inexperientes em relação ao forrageio em flores de suas plantas hospedeiras de *Campanula*, muito embora elas já tivessem experiência de forrageio em relação a plantas melíferas não hospedeiras.

A atração de abelhas inexperientes e experientes (machos e fêmeas) aos compostos ativos no EAD foi testada em experimentos de duas escolhas, utilizando-se dois cilindros de vidro de quartzo pretos (29 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro) com 60 furos (0,2 cm de diâmetro), os mesmos utilizados por Burger *et al.* (2010).

Oito experimentos de duas escolhas foram realizados com os compostos sintéticos: 1) mistura com todos os compostos ativos eletrofisiologicamente (daqui em diante mistura completa) vs. controle; 2) espiroacetais vs. controle; 3) terpenos vs. controle; 4) benzenóides vs. controle; 5) alifáticos (daqui em diante 2-nonanona) vs. controle; 6) mistura completa vs. espiroacetais; 7) mistura completa vs. inflorescências de *Ca. trachelium* e 8) espiroacetais vs. inflorescências. Para os experimentos de duas escolhas 1 a 6, um papel filtro foi impregnado com 10 µl da mistura a ser testada, quantidade equivalente aos voláteis emitidos por cerca de 80 flores. Como controle, foi utilizado um papel filtro, impregnado com 10 µl de acetona. Nos experimentos 7 e 8, as inflorescências utilizadas tinham oito flores (uma vez que 80 flores não caberiam nos cilindros), e nesse caso, apenas 1 µl das misturas (equivalente aos voláteis emitidos por 8 flores) foi impregnado em um papel filtro. O ar no interior do cilindro, enriquecido com os voláteis das misturas ou inflorescências, foi soprado através dos buracos por uma bomba de membrana (G12/01 EB, Rietschle Thomas, Puchheim, Alemanha) com um fluxo de ar de 1 l/min.

Os experimentos foram conduzidos apenas em dias ensolarados entre 10:00 e 15:00 h, horário em que as abelhas estavam mais ativas. Cada experimento teve duração de 30 min e, após os primeiros 15 min, a posição dos dois cilindros foi trocada. Os cilindros pareados em cada experimento foram colocados a uma distância de 1,5 metros. Como resposta comportamental foram registrados apenas vôos em direção aos cilindros a uma distância de 5 cm ou menos.

As abelhas que responderam aos cilindros foram coletadas com redes entomológicas, armazenadas em isopor com gelo até o fim do experimento em desenvolvimento e, só então, soltas novamente na gaiola. Esse procedimento evitou pseudo-replicações, contagem de mais de uma resposta por indivíduo em um determinado experimento. Experimentos que não obtiveram respostas suficientes para análises estatísticas foram repetidos uma vez e, nesse caso, as abelhas foram codificadas com marcadores coloridos permanentes antes de serem liberadas na gaiola, para evitar recontagem dos mesmos indivíduos na repetição dos experimentos. Devido a fatores estocásticos, tais como mortalidade e fuga, o número de

abelhas presente na gaiola variou entre os experimentos (de 60 a 100 indivíduos; machos e fêmeas).

Os experimentos com abelhas inexperientes foram conduzidos primeiramente e, assim que finalizados, plantas de *Ca. trachelium* foram colocadas na gaiola experimental para que as abelhas adquirissem experiência de forrageio nas flores de plantas hospedeiras. Após três dias de forrageio com plantas hospedeiras dentro da gaiola, todos os experimentos foram repetidos com as abelhas, agora, experientes. No início da manhã, antes dos experimentos com abelhas inexperientes e experientes, todas as plantas foram removidas da gaiola e recolocadas apenas ao término dos experimentos.

#### **4.3.6. Análises estatísticas**

A diferença nas respostas das abelhas (inexperientes e experientes) em cada experimento de duas escolhas foi verificada a partir de testes de Qui-quadrado, comparando eventos observados e esperados. As respostas de machos e fêmeas foram unidas, uma vez que ambos os sexos responderam igualmente aos sinais olfativos (Milet-Pinheiro *et al.* capítulo 3). Todos os testes foram rodados no programa Statistica 7.0 (StatSoft 2004). As diferenças foram testadas apenas para aqueles experimentos que obtiveram mais de dez respostas de abelhas.

### **4.4. Resultados**

#### **4.4.1. Voláteis florais**

Como pode ser observado na tabela 1, o buquê de odores das inflorescências de *Ca. trachelium* consistiu de 59 compostos, pertencentes a seis classes: sesquiterpenos (32 compostos); monoterpenos (10); benzenóides (5); espiroacetais (5); alifáticos (3); terpenos irregulares (1) e desconhecida (3). A análise de voláteis florais mostrou que uma única flor emitiu, em média, 3,4 ng/h com máxima e mínima de 5,2 e 1,3 ng/h, respectivamente. Dezoito compostos também foram emitidos por folhas e outras partes vegetativas, contudo, em menores quantidades que nas flores (Tabela 1).

A classe de monoterpenos foi dominante, correspondendo, em média, a 43,6 % do total de voláteis emitidos por uma flor de *Ca. trachelium*, seguido por alifáticos (29,3 %), sesquiterpenos (15,5 %), benzenóides (8,6 %) e espiroacetais (1,7 %). Seis compostos corresponderam a cerca de 75 % do total de voláteis emitidos, onde (*E*)- $\beta$ -ocimeno foi o mais abundante (em média 36,2 %), seguido por (*Z*)-3-hexenil acetato (24,3 %), 2-feniletanol

(4,7 %), (Z)- $\beta$ -ocimeno (4,3 %), tridecano (3,8 %), e fenilacetaldéido (3 %). Nove voláteis foram produzidos em quantidades relativas entre 1 e 2 % cada, enquanto a maioria dos compostos (44) foram produzidos em quantidades muito pequenas (menos de 1 % cada).

**Tabela 1** Quantidade absoluta e relativa (máxima, mínima e média) de voláteis florais de inflorescências de *Campanula trachelium* (N = 6), coletados a partir da técnica de *headspace* dinâmico. Os voláteis foram listados de acordo com a eluição em uma coluna ZB-5. Classes de compostos - A (alifáticos), MT (monoterpenos), B (benzenóides), S (espiroacetais), ST (sesquiterpenos), TI (terpenos irregulares), e D (desconhecido). KRI – Índice de retenção de Kovats.

	KRI	Classe	Máx	Min	Média
Quantidade absoluta de voláteis florais (ng/h*flor)			5.2	1.3	3.4
(Z)-3-Hexenil acetato <sup>*†</sup>	1008	A	39,79	1,82	24,25
$\delta$ -3-Careno <sup>†</sup>	1021	MT	0,31	0,27	0,29
(Z)- $\beta$ -Ocimeno <sup>*†</sup>	1041	MT	3,97	5,36	4,34
(E)- $\beta$ -Ocimeno <sup>*†a</sup>	1053	MT	24,24	49,55	36,18
Fenilacetaldéido <sup>*†a</sup>	1057	B	3,41	0,02	2,98
1,6-Dioxa-spiro[4.5]decano <sup>*†a</sup>	1058	S	0,01	0,02	0,01
7-Metil-1,6-dioxa-spiro[4.5]decano (conophthorin) <sup>*b</sup>	1067	S	0,47	0,53	0,42
Desconhecido <i>m/z</i> 41, 57, 69, 85, 119, 127 <sup>†</sup>	1088	D	0,03	0,01	0,03
2-Nonanona <sup>c</sup>	1094	A	1,0	2,85	1,24
Óxido de (E)-Linalol (furanóide) <sup>*c</sup>	1094	B	0,05	0,02	0,05
Guaiacol <sup>*c</sup>	1096	MT	0,09	0,01	0,06
Terpinoleno <sup>*†c</sup>	1098	MT	0,09	0,07	0,07
Linalol <sup>*†d</sup>	1103	MT	1,31	4,94	1,81
2-Feniletanol <sup>*e</sup>	1126	B	3,41	5,12	4,74
p-Cimeno <sup>*†</sup>	1133	MT	0,37	0,03	0,40
Óxido de (E)-Ocimene	1147	MT	0,31	0,03	0,29
2-Metil-1,7-dioxa-spiro[5.5]undecano <sup>*f</sup>	1152	S	0,15	0,28	0,14
(E,Z)-7-Etil-1,6-dioxa-spiro[4.5]decano <sup>*f</sup>	1156	S	0,85	1,69	1,00
$\alpha$ -Terpineol <sup>*†</sup>	1203	MT	0,1	0,01	0,05
Salicilato de metila <sup>*†g</sup>	1209	B	0,88	0,17	0,73
Verbenona <sup>*</sup>	1227	MT	0,06	0,01	0,06
(E,E)-7-Etil-1,6-dioxa-spiro[4.5]decano <sup>*</sup>	1231	S	0,07	0,15	0,09
Desconhecido <i>m/z</i> 39, 66, 79, 91, 107, 135	1238	D	0,68	1,72	1,08
2-Feniletil acetato <sup>*h</sup>	1266	B	0,06	0,25	0,08
Tridecano <sup>*</sup>	1300	A	6,66	1,95	3,81
Desconhecido <i>m/z</i> 39, 77, 93, 107, 123, 138	1351	D	0,09	0,24	0,12
$\alpha$ -Cubebeno	1369	ST	0,1	0,38	0,17
Sesquiterpeno 1	1378	ST	0,09	0,49	0,19
$\alpha$ -Longipineno	1379	ST	0,05	0,26	0,10

	KRI	Classe	Máx	Min	Média
$\alpha$ -Ylangeno	1392	ST	0,27	0,94	0,45
$\alpha$ -Copaeno <sup>*i</sup>	1397	ST	0,17	0,36	0,28
Longifoleno	1402	ST	0,07	0,01	0,09
$\beta$ -Elemeno	1411	ST	0,93	1,06	1,46
Sesquiterpeno 2 + 3	1425	ST	0,03	0,01	0,03
Sesquiterpeno 4	1433	ST	0,11	0,58	0,18
Sesquiterpeno 5 + 6 <sup>†</sup>	1438	ST	0,14	0,01	0,10
Sesquiterpeno 7 <sup>†</sup>	1440	ST	0,05	0,01	0,05
Sesquiterpeno 8	1441	ST	0,05	0,01	0,03
Sesquiterpeno 9	1445	ST	0,29	0,52	0,34
(E)- $\beta$ -Cariofileno <sup>*</sup>	1449	ST	0,31	1,43	0,53
(E)- $\alpha$ -Bergamoteno <sup>*†</sup>	1454	ST	0,9	4,01	1,68
(E)-Geranilacetona <sup>*†j</sup>	1460	TI	0,08	0,64	0,18
(E)- $\beta$ -Farneseno <sup>*</sup>	1463	ST	0,9	1,93	1,33
$\beta$ -Barbateno	1482	ST	1,27	0,02	1,27
Amorfa-4,11-dieno	1485	ST	0,38	0,52	0,78
Prezizaeno <sup>†</sup>	1487	ST	1,2	0,04	0,63
Sesquiterpeno 10 <sup>†</sup>	1495	ST	0,43	1,34	0,55
ar-Curcumeno	1497	ST	0,73	1,59	0,77
(Z,E)- $\alpha$ -Farneseno <sup>*</sup>	1505	ST	0,23	0,94	0,37
Gemacreno D <sup>*</sup>	1509	ST	0,32	0,66	0,51
$\beta$ -Selineno <sup>*</sup>	1517	ST	0,46	0,89	0,56
$\alpha$ -Muuroleno <sup>*</sup>	1524	ST	0,72	0,95	1,08
$\alpha$ -Selineno	1527	ST	0,34	0,01	0,47
(Z)- $\gamma$ -Bisaboleno	1535	ST	0,38	1,02	0,60
$\beta$ -Sesquifelandreno	1542	ST	0,33	1,34	0,54
$\delta$ -Cadineno <sup>*</sup>	1547	ST	0,17	0,89	0,31
$\alpha$ -Calacoreno	1572	ST	0,05	0,02	0,06

Compostos com letras sobrescritas foram ativos eletrofisiologicamente (a-j). Compostos com as mesmas letras sobrescritas eluíram simultaneamente nas análises de GC-EAD.

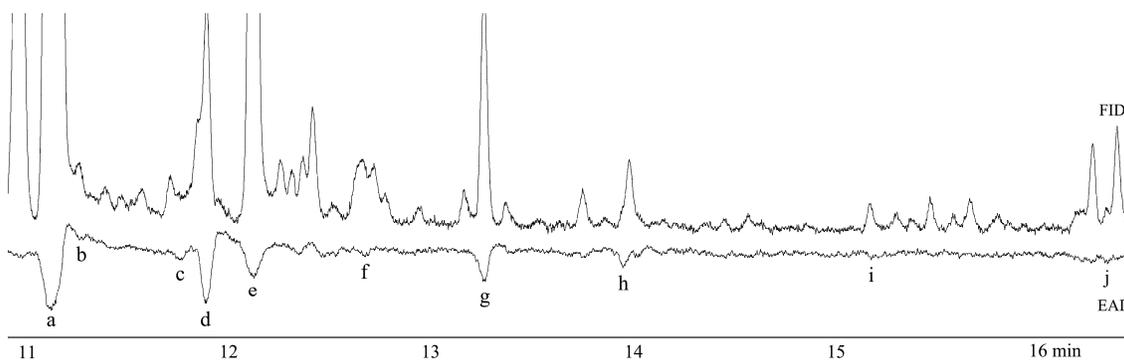
<sup>\*</sup>, Identificação baseada em compostos referências (padrões autênticos).

<sup>†</sup>, Compostos também encontrados em amostras de *headspace* de plantas sem flores, mas em menor quantidade do que nas amostras de plantas em floração.

#### 4.4.2. Eletrofisiologia

Nas análises de GC-EAD com amostras de odores das inflorescências de *Ca. trachelium*, foram obtidas dez respostas nas antenas de *Ch. rapunculi* (Fig. 1). Uma vez que alguns compostos eluíram simultaneamente, as respostas das antenas não foram necessariamente relacionadas a uma única substância. Entre os compostos que estimularam

respostas nas antenas estão benzenóides (5 compostos), monoterpênicos (4) e espiroacetais (4). Embora nonanal + linalol e dodecanal + salicilato de metila tenham estimulado fortes respostas nas antenas (Fig. 1), nonanal e decanal foram encontrados nas amostras do ambiente (controle) na mesma quantidade que nas amostras de inflorescências e, conseqüentemente, foram tratados como artefatos.



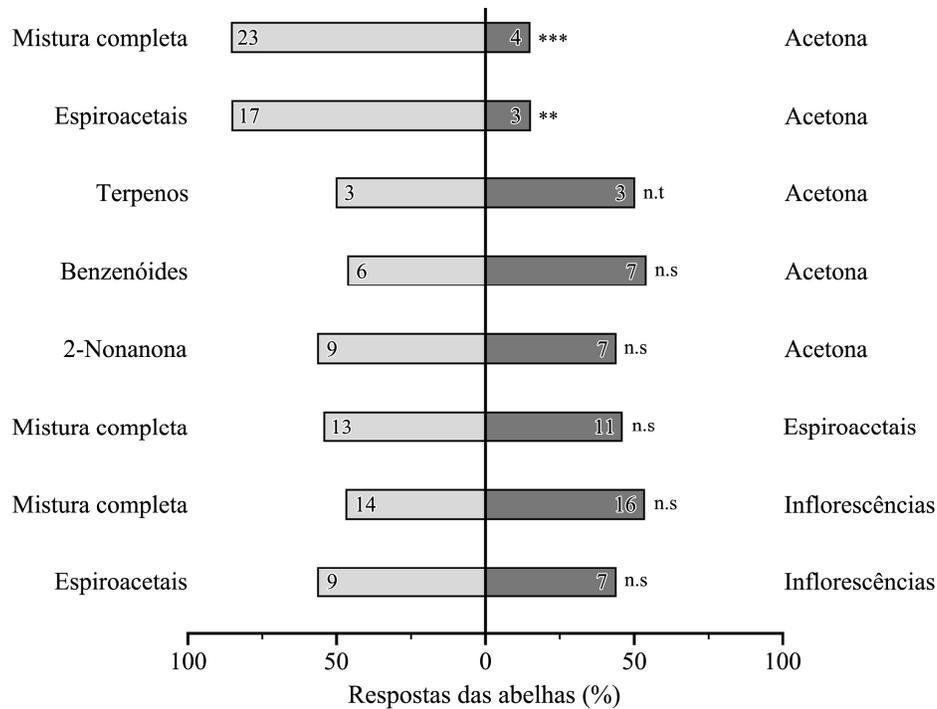
**Fig. 1** Exemplo de uma análise de cromatografia gasosa acoplada à detecção eletroantenográfica (GC-EAD) de uma amostra de *headspace* de inflorescências de *Campanula trachelium*, utilizando a antena de uma fêmea de *Chelostoma rapunculi*. (a) (E)- $\beta$ -ocimeno + fenilacetaldéido + 1,6-[4.5]decano; (b) conophthorin; (c) 2-nonanona + guaiacol + terpinoleno + óxido de (E)-linalol; (d) linalol + nonanal (artefato); (e) 2-feniletanol; (f) 2-metil-1,7-dioxa-spiro[5.5]undecano + (E,Z)-7-etil-1,6-dioxa-spiro[4.5]decano; (g) dodecanal (artefato) + salicilato de metila; (h) 2-feniletil acetato; (i)  $\alpha$ -copaeno e (j) (E)-geranilacetona.

#### 4.4.3. Experimentos comportamentais

Os experimentos comportamentais com as misturas sintéticas mostraram que compostos ativos eletrofisiologicamente também estimulam respostas comportamentais nas abelhas inexperientes e experientes de *Ch. rapunculi*.

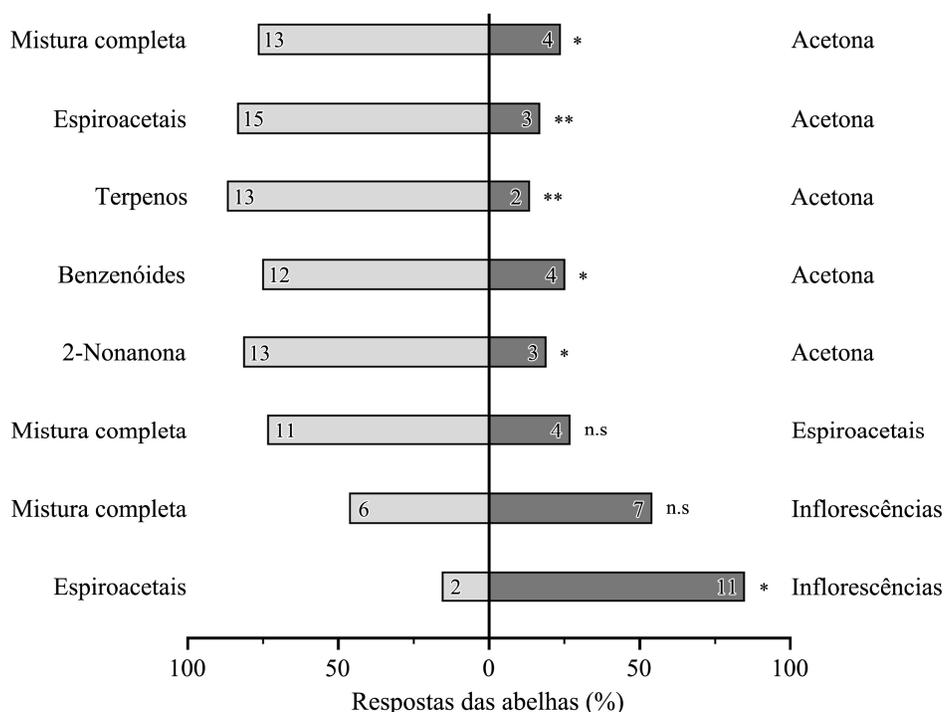
Em abelhas inexperientes, apenas as misturas de todos os compostos ativos eletrofisiologicamente, e a mistura de espiroacetais (1,6-dioxa-spiro[4.5] decano, conophthorin, 2-metil-1,7-dioxa-spiro[5.5]undecano, 7-etil-1,6-dioxa-spiro[4.5]decano) atraíram significativamente mais indivíduos de abelhas (machos e fêmeas) do que controles de acetona (teste de Qui-quadrado,  $p < 0,05$  cada; Fig. 2). Alternativamente, as misturas com terpenos [(E)- $\beta$ -ocimeno, terpinoleno, óxido de (E)-linalol, linalol,  $\alpha$ -copaeno, (E)-geranilacetona], benzenóides (fenilacetaldéido, guaiacol, 2-feniletanol, salicilato de metila, 2-feniletil acetato), e alifáticos (2-nonanona) não foram mais atrativas do que os controles de acetona (teste de Qui-quadrado,  $p > 0,05$  cada). A mistura completa e de espiroacetais atraíram abelhas similarmente quando oferecidas simultaneamente. Essas duas misturas

foram tão atrativas quanto inflorescências de *Ca. trachelium* às abelhas inexperientes de *Ch. rapunculi*.



**Fig. 2** Respostas de abelhas inexperientes de *Chelostoma rapunculi* (machos + fêmeas) a misturas sintéticas e inflorescências de *Campanula trachelium* em experimentos de duas escolhas. Os números dentro das barras indicam o número absoluto das respostas das abelhas. As diferenças nos experimentos de duas escolhas foram verificadas a partir de testes de Qui-quadrado, comparando a frequência de eventos observados vs. esperados. n.t (diferença não testada), n.s (diferença não significativa,  $p > 0,05$ ),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

Em abelhas experientes, todas as misturas atraíram mais abelhas de *Ch. rapunculi* do que os controles de acetona (Fig. 3). Inflorescências de *Ca. trachelium* tiveram a mesma atratividade que a mistura completa, mas foram significativamente mais atrativas do que a mistura de espiroacetais. A mistura completa foi marginalmente mais atrativa do que a de espiroacetais ( $p = 0,07$ ).



**Fig. 3** Respostas de abelhas experientes de *Chelostoma rapunculi* (machos + fêmeas) a misturas sintéticas e inflorescências de *Campanula trachelium* em experimentos de duas escolhas. Os números dentro das barras indicam o número absoluto das respostas das abelhas. As diferenças nos experimentos de duas escolhas foram verificadas a partir de testes de Qui-quadrado, comparando a frequência de eventos observados vs. esperados. n.s (diferença não significativa,  $p > 0,05$ ),  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*).

#### 4.5. Discussão

Nesse estudo, foi mostrado pela primeira vez que abelhas oligoléticas recém-emergidas utilizam compostos florais específicos para reconhecer suas plantas hospedeiras. As espiroacetais, compostos florais raros encontrados em *C. trachelium*, estimularam a antena das abelhas de *Ch. rapunculi* em testes de GC-EAD. Posteriormente, testes comportamentais com misturas sintéticas confirmaram que essas substâncias eram ativas biologicamente, e as únicas capazes de atrair abelhas inexperientes, sendo responsáveis, consequentemente, pelo reconhecimento inato das plantas hospedeiras por *Ch. rapunculi*. Esse estudo abre caminho para investigações futuras. *Ch. rapunculi* coleta pólen em diversas espécies de *Campanula*. Assim, as espiroacetais poderiam ser marcadores florais para o gênero *Campanula* e não apenas para a espécie *Ca. trachelium*. Além do mais, espécies de *Campanula* são fontes exclusivas de pólen para diversas espécies de abelhas oligoléticas de diferentes famílias tais como, *Andrena bicolor* (Andrenidae), *Lassioglossum costulatum* (Halictidae), *Melitta*

*haemorrhodales* (Mellitidae), entre outras. A avaliação do reconhecimento químico inato por parte dessas outras espécies pode revelar uma convergência evolutiva neurológica nessas abelhas para o reconhecimento de suas plantas hospedeiras.

#### **4.5.1. Voláteis florais de *Campanula trachelium***

A maioria dos voláteis encontrados nas inflorescências de *Ca. trachelium*, incluindo os compostos dominantes (e.g. (*E*)- e (*Z*)-  $\beta$ -ocimeno, (*Z*)-3-hexenil acetato, 2-feniletanol, tridecano, e fenilacetaldéido), são substâncias muito comuns, presentes nas flores das mais variadas espécies vegetais (Knudsen *et al.* 2006). No entanto, foram encontradas também espiroacetais, que são substâncias extraordinariamente raras entre os voláteis florais conhecidos. De fato, em uma revisão dos compostos florais de 991 espécies de angiospermas, Knudsen *et al.* (2006) cita apenas seis espiroacetais. Quatro das cinco espiroacetais encontradas em *Ca. trachelium* (1,6-dioxa-spiro[4.5]decano, 2-metil-1,7-dioxa-spiro[5.5]undecano, (*E,E*)- e (*E,Z*)-7-etil-1,6-dioxa-spiro[4.5]decano) são novos registros de voláteis florais. A única exceção foi 7-metil-1,6-dioxa-spiro[4.5]decano (conophthorin), que já foi identificada em odores florais de pelo menos 13 famílias.

Espiroacetais são frequentemente encontradas em micróbios, fungos, insetos e organismos marinhos (Perron & Albizati 1989; Raju & Saikia 2008). De uma forma geral, esses compostos são importantes como feromônios de alarme, agregação ou sexual de insetos (Francke & Kitching 2001). Entre as cinco espiroacetais identificadas nas flores de *Ca. trachelium*, conophthorin e 2-metil-1,7-dioxa-spiro[5.5]undecano, também foram encontradas em secreções glandulares cefálicas de abelhas, além de besouros, moscas e vespas (Francke & Kitching 2001). Embora o papel biológico dessas duas substâncias para abelhas não seja conhecido, sabe-se que conophthorin atua como repelente, inibidor de apetite ou espaçador para vários besouros da família Scolitidae (Birgersson *et al.* 1995; Pierce *et al.* 1995; Zhang *et al.* 2001; Zhang & Schlyter 2003), e que 2-metil-1,7-dioxa-spiro[5.5]undecano atua como sinal de subserviência na vespa *Goniozus legneri* (Bethylidae), sendo emitido por indivíduos derrotados em embates (Goubault *et al.* 2006). Curiosamente, a despeito da função bem conhecida como feromônios de insetos, o papel de espiroacetais na comunicação química entre flor e polinizador é citado aqui pela primeira vez.

#### **4.5.2. Reconhecimento inato de *Campanula trachelium* por *Chelostoma rapunculi***

Abelhas inexperientes de *Ch. rapunculi* utilizam sinais visuais e olfativos para encontrar plantas hospedeiras (Milet-Pinheiro *et al.*, capítulo 2) e, neste trabalho, foram

identificados os sinais olfativos específicos por elas utilizados para reconhecer plantas hospedeiras de *Ca. trachelium*. Entre os compostos ativos eletrofisiologicamente, a mistura completa de voláteis florais de *Ca. trachelium* e a mistura de espiroacetais foram as únicas efetivas em atrair abelhas inexperientes. Além do mais, a mistura de espiroacetais teve a mesma atratividade que a mistura completa e que inflorescências de *Ca. trachelium*. Isto indica que as espiroacetais são compostos chave na comunicação entre flores de *Ca. trachelium* e fêmeas e machos de *Ch. rapunculi*. Como são os únicos compostos responsáveis pelo reconhecimento inato de plantas hospedeiras, abelhas *Ch. rapunculi* devem ser providas de adaptações olfativas, geneticamente determinadas, capazes de perceber esses compostos químicos.

As espiroacetais foram testadas em mistura e, conseqüentemente, é necessário verificar se apenas um desses compostos ou uma mistura de dois ou mais é biologicamente importante para o reconhecimento das flores de *Ca. trachelium*. Estudos em outros sistemas especializados mostram que tanto compostos isolados quanto em mistura podem ser crucial na atração de polinizadores (Ayasse 2006). Ainda assim, os resultados corroboram a hipótese de que abelhas oligoléticas *Ch. rapunculi* utilizam voláteis florais raros para reconhecer plantas hospedeiras de *Ca. trachelium* e mostram, pela primeira vez, que espiroacetais estão envolvidas em interações entre plantas e polinizadores. Considerando que *Ch. rapunculi* também coleta pólen em outras espécies de *Campanula* (Westrich 1989; Schlindwein *et al.* 2005), seria interessante verificar se esses compostos são espécie-específicos para *Ca. trachelium* ou se eles também ocorrem em outras espécies de *Campanula*, atuando possivelmente como um sinal gênero-específico para o reconhecimento das plantas hospedeiras por essa abelha oligolética. Isto é particularmente importante para *Ch. rapunculi*, uma vez que suas larvas não se desenvolvem em pólen de outras espécies vegetais (Praz, Müller & Dorn 2008).

A despeito da sua função chave no reconhecimento de plantas hospedeiras por *Ch. rapunculi*, as espiroacetais ocorrem em concentrações baixas; os cinco compostos somaram apenas 1,7 % do total de voláteis emitidos pelas flores de *Ca. trachelium*. Isto demonstra a grande sensibilidade olfativa destas abelhas para percepção destes compostos, parecidos com feromônios sexuais. O reconhecimento de plantas hospedeiras, mediado por compostos raros emitidos em quantidades mínimas, também foi registrado para outra interação especializada. A abelha oligolética *C. florisomne* visita apenas flores de *Ranunculus* (Ranunculaceae). O buque de voláteis florais de *Ranunculus acris* é dominado por compostos comuns (i.e. (*E*)- $\beta$ -

ocimeno, 2-feniletanol, furanóide,  $\beta$ -selineno), mas abelhas inexperientes de *C. florissomme* usam apenas o composto raro protoanemonina, o qual é emitido em quantidades extremamente reduzidas, para encontrar flores de *R. acris* (Bergström *et al.* 1995; Dobson & Bergström 2000).

Alternativamente, *Andrena vaga* e *Peponapis pruinosa*, especializadas respectivamente em flores de *Salix* e *Cucurbita*, utilizam voláteis florais comuns e abundantes para encontrar suas plantas hospedeiras (Dötterl *et al.* 2005; Granero *et al.* 2005; Andrews, Theis & Adler 2007). Os compostos envolvidos na atração de *A. vaga* (1,4-dimetoxibenzeno, salicilato de metila, (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno e 2-feniletanol) e *P. pruinosa* (1,2,4-trimetoxibenzeno e (*E*)-cinnamaldeído) são muito comuns em flores de angiospermas e, conseqüentemente, não podem ser a chave para o reconhecimento das plantas hospedeiras. Considerando que ambos os estudos foram realizados com abelhas no campo, possivelmente experientes, o papel desses compostos na atração de abelhas inexperientes ainda precisa ser confirmado. Essas espécies poderiam utilizar os compostos mais abundantes e comuns para localizar flores hospedeiras a maiores distâncias. Enquanto que, após a aproximação, compostos florais mais específicos e menos voláteis seriam responsáveis pelo reconhecimento específico das fontes exclusivas de pólen (Dötterl & Vereecken 2010).

#### **4.5.3. Mudança no padrão inato de forrageio de *Chelostoma rapunculi***

Após forragear por néctar e pólen nas flores de *Campanula*, abelhas de *Ch. rapunculi* se comportaram de forma diferente. Em contraste com abelhas inexperientes, que responderam apenas às misturas completa e de espiroacetais, abelhas experientes responderam a todas as classes de substâncias testadas. Além do mais, as espiroacetais se tornaram menos atrativas do que inflorescências de *Ca. trachelium*. Esses resultados mostram, que nem um segundo passo, a experiência adquirida pelas abelhas acrescenta outros sinais químicos no processo de reconhecimento das plantas hospedeiras específicas, o que também já foi observado em outras espécies oligoléticas (Dobson 1987; Dobson & Bergström 2000; Dötterl *et al.* 2005).

Essa alteração no padrão inato de busca, mediada pela experiência, deve estar relacionada de alguma forma à otimização na eficiência de forrageio, através de aprendizado. Uma vez que larvas de *Ch. rapunculi* requerem uma quantidade imensa de grãos de pólen (Schlindwein *et al.* 2005; Müller *et al.* 2006), as abelhas precisam encontrar flores hospedeiras rapidamente para prover suas larvas com alimento suficiente. Assim, compostos químicos adicionais, que possam ser percebidos a maiores distâncias, podem ser fontes

importantes de informação e conferir certa vantagem para as abelhas. Os compostos atrativos após experiência de forrageio, são emitidos por flores de *Ca. trachelium* em maiores quantidades do que as espiroacetais. Provavelmente, essas substâncias adicionais podem ser percebidas pelas abelhas a maiores distâncias, o que facilita a localização de flores hospedeiras e, conseqüentemente, otimiza a eficiência de forrageio.

#### 4.6. Agradecimentos

Nós agradecemos Hannah Burger e Irmgard Schäffler pelo suporte metodológico e discussões construtivas, Hans-Joachim Flügel (Lebendiges Bienenmuseum Knüllwald) e Jochen Fründ (Universidade de Göttingen, Alemanha) por cederem gentilmente ninhos de *Chelostoma rapunculi*. Bolsas foram providas a PM-P (DAAD/CAPES/CNPq) e CS (CNPq/CAPES).

#### 4.7. Literatura citada

- Andrews, E.S., Theis, N. & Adler, L.S. (2007) Pollinator and herbivore attraction to *Curcubita* floral volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, **33**, 1682-1691.
- Ayasse, M. (2006) Floral scent and pollinator attraction in sexually deceptive orchids. *Biology of Floral Scent* (eds N. Dudareva & E. Pichersky), pp. 219-242. CRC Press, Boca Raton.
- Ayasse, M., Schiestl, F.P., Paulus, H.F., Löfstedt, C., Hansson, B., Ibarra, F. & Francke, W. (2000) Evolution of reproductive strategies in the sexually deceptive orchid *Ophrys sphegodes*: how does flower-specific variation of odor signals influence reproductive success? *Evolution*, **54**, 1995-2006.
- Bergström, G., Dobson, H.E.M. & Groth, I. (1995) Spatial fragrance patterns within the flowers of *Ranunculus acris* (Ranunculaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **195**, 221-242.
- Birgersson, G., Debarr, G.L., Groot, P., Dalusky, M.J., Pierce, H.D., Borden, J.H., Meyer, H., Francke, W., Espelie, K.E. & Berisford, C.W. (1995) Pheromones in white pine cone beetle, *Conophthorus coniperda* (Schwarz) (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Chemical Ecology*, **21**, 143-167.

- Burger, H., Ayasse, M., Häberlein, C.M., Schulz, S. & Dötterl, S. (2010) *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. (2010) Host-plant finding and recognition by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee. *Functional Ecology*, **24**, 1234-1240.
- Cane, J.H. & Sipes, S. (2006) Characterizing floral specialization by bees: analytical methods and revised lexicon for oligolecty. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization* (eds N.M. Waser & J. Ollerton), pp. 99-121. The University of Chicago Press, Chicago.
- Chittka, L. & Raine, N.E. (2006) Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**, 428-435.
- Dobson, H.E.M. (1987) Role of flower and pollen aromas in host-plant recognition by solitary bees. *Oecologia*, **72**, 618-623.
- Dobson, H.E.M. & Bergström, G. (2000) The ecology of pollen odors. *Plant Systematics and Evolution*, **222**, 63-87.
- Dobson, H.E.M., Bergström, G. & Groth, I. (1990) Differences in fragrance chemistry between flower parts of *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae). *Israel Journal of Botany*, **39**, 143-156.
- Dobson, H.E.M., Danielson, E.M. & Van Wesep, I.D. (1999) Pollen odor chemicals as modulators of bumble bee foraging on *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae). *Plant Species Biology*, **14**, 153-166.
- Dobson, H.E.M., Groth, I. & Bergström, G. (1996) Pollen advertisement: Chemical contrasts between whole-flower and pollen odors. *American Journal of Botany*, **83**, 877-885.
- 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. & Jürgens, A. (2005) Spatial fragrance patterns in flowers of *Silene latifolia*: Lilac compounds as olfactory nectar guides? *Plant Systematics and Evolution*, **255**, 99-109.
- Dötterl, S. & Schäffler, 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, J.N. (2010) The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: a review and perspectives. *Canadian Journal of Zoology*, **88**, 668-697.

- Dötterl, S., Wolfe, L.M. & Jürgens, A. (2005) Qualitative and quantitative analyses of flower scent in *Silene latifolia*. *Phytochemistry*, **66**, 203-213.
- Francke, W. & Kitching, W. (2001) Spiroacetals in insects. *Current Organic Chemistry*, **5**, 233-251.
- Goubault, M., Batchelor, T.P., Linforth, R.S.T., Taylor, A.J. & Hardy, I.C.W. (2006) Volatile emission by contest losers revealed by real-time chemical analysis. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, **273**, 2853-2859.
- Granero, A.M., Gonzalez, F.J.E., Sanz, J.M.G. & Vidal, J.L.M. (2005) Analysis of the biogenic volatile organic compounds in zucchini flowers: identification of scent sources. *Journal of Chemical Ecology*, **31**, 2310-2322.
- Howell, A.D. & Alarcón, R. (2007) *Osmia* bees (Hymenoptera: Megachilidae) can detect nectar-rewarding flowers using olfactory cues. *Animal Behaviour*, **74**, 199-205.
- Knudsen, J.T., Eriksson, R., Gershenzon, J. & Stahl, B. (2006) Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review*, **72**, 1-120.
- Lunau, K. (1995) Notes on the colour of pollen. *Plant Systematics and Evolution*, **198**, 235-252.
- Müller, A., Diener, S., Schnyder, S., Stutz, K., Sedivy, C. & Dorn, S. (2006) Quantitative pollen requirements of solitary bees: implications for bee conservation and the evolution of bee-flower relationships. *Biological Conservation*, **130**, 604-615.
- Müller, A. & Kuhlmann, M. (2008) Pollen hosts of western palaeartic bees of the genus *Colletes* (Hymenoptera: Colletidae): the Asteraceae paradox. *Biological Journal of the Linnean Society*, **95**, 719-733.
- Perron, F. & Albizati, K.F. (1989) Chemistry of Spiroketals. *Chemical Review*, **89**, 1617-1661.
- Pierce, H.D., Groot, P., Borden, J.H., Ramaswamy, S. & Oehlschlager, A.C. (1995) Pheromones in red pine cone beetle, *Conophthorus resinosae* Hopkins, and its synonym, *C. banksianae* McPherson (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Chemical Ecology*, **21**, 169-185.
- Praz, C.J., Müller, A. & Dorn, S. (2008) Specialized bees fail to develop on non-host pollen: do plants chemically protect their pollen. *Ecology*, **89**, 795-804.
- Raju, B.R. & Saikia, A.K. (2008) Asymmetric synthesis of naturally occurring spiroketals. *Molecules*, **13**, 1942-2038.
- Robertson, C. (1925) Heterotropic bees. *Ecology*, **6**, 412-436.

- 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 Systematics and Evolution*, **250**, 147-156.
- StatSoft, I. (2004) STATISTICA (data analysis software system).
- Westrich, P. (1989) *Die Wildbienen Baden-Württembergs: Spezieller Teil: Die Gattungen und Arten*. Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Zhang, Q., Liu, G., Schlyter, F., Birgersson, G., Anderson, P. & Valeur, P. (2001) Olfactory responses of *Ips duplicatus* from inner Mongolia, china to nonhost leaf and bark volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, **27**, 995-1009.
- Zhang, Q. & Schlyter, F. (2003) Redundancy, synergism, and active inhibitory range of non-host volatiles in reducing pheromone attraction in European spruce bark beetle *Ips typographus*. *Oikos*, **101**, 299–310.

**Artigo publicado na revista *Annals of Botany***

**5. A dependência reprodutiva mútua entre a planta distílica *Cordia leucocephala* (Cordiaceae) e a abelha oligolética *Ceblurgus longipalpis* (Halictidae, Rophitinae) na Caatinga**

Autores: Paulo Milet-Pinheiro<sup>1</sup> e Clemens Schindwein<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50670-901 Recife, PE, Brasil; (miletpinheiro@hotmail.com).

<sup>2</sup> Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50670-901 Recife, PE, Brasil; (schlindw@ufpe.br).

## 5.1. Resumo

No presente estudo foi investigada a relação entre a planta distílica *Cordia leucocephala* e abelhas de *Ceblurgus longipalpis*, enfatizando a dependência reprodutiva mútua, adaptações morfológicas dos parceiros e o fluxo polínico. A pesquisa foi desenvolvida no município de Pedra, Pernambuco, nordeste brasileiro, onde foram determinados o sistema reprodutivo, frutificação e o fluxo legítimo e ilegítimo de pólen de *Co. leucocephala*, bem como a interação com visitantes florais. *Ceblurgus longipalpis*, o único visitante floral e polinizador da espécie xenogâmica *Cordia leucocephala*, apresenta caracteres morfológicos adaptados para explorar o pólen e néctar escondidos na base das corolas tubulares estreitas. O pólen dos estames curtos é coletado com pêlos nas peças bucais alongadas, enquanto o pólen de estames longos com o clípeo, mandíbulas e labro. Pólen de flores brevi e longistilas foram removidos com a mesma eficiência, o que gerou um fluxo polínico legítimo similar entre as morfais. O fluxo polínico ilegítimo para estigmas de flores longistilas, no entanto, foi maior do que para os estigmas de flores brevistilas. Adicionalmente, mais pólen ilegítimo foi depositado em estigmas de flores longistilas e menos naqueles de flores brevistilas quando comparado com fluxo legítimo de pólen. O presente estudo revela uma interdependência mútua entre os parceiros. Os dados indicam um dos raros casos de monoletia entre abelhas. *Ceblurgus longipalpis*, a única espécie de Rophitinae no Brasil, desenvolveu peças bucais alongadas e pilosas incomuns entre abelhas de línguas curtas para explorar o pólen escondido de flores longistilas (inacessível para outras espécies de abelhas) e o néctar na base do tubo floral.

**Palavras-chave:** Abelhas especialistas, *Caatinga*, Heterostilia, Nordeste brasileiro, Polinização, Rophitinae.

## 5.2. Introdução

A relação entre plantas e polinizadores abrange desde interações não especializadas, nas quais flores atraem e são polinizadas por inúmeras espécies de animais, até relações altamente especializadas, que envolvem poucas espécies de polinizadores, geralmente providos de adaptações morfológicas e comportamentais, o que permite uma maior eficiência na coleta de recursos. Recentemente, diversos temas envolvendo especialistas e generalistas têm despertado o interesse da comunidade científica (Armbruster, 2006; Jordano *et al.*, 2006; Minckley e Roulston, 2006; Ollerton *et al.*, 2006; Petanidou e Potts, 2006; Vásquez e Aizen, 2003; 2006). Abelhas oligoléticas, por exemplo, são especialistas que alimentam suas larvas com pólen de plantas do mesmo gênero ou família (Robertson, 1925; Wcislo e Cane, 1996; Cane e Sipes, 2006). Análises filogenéticas recentes mostram que nos grupos onde abelhas oligoléticas são comuns, a oligoletia é o caráter basal e a poliletia o derivado (Müller, 1996a; Sipes e Tepedino, 2005; Danforth *et al.*, 2006; Patiny *et al.*, 2007; Larkin *et al.*, 2008; Sedivy *et al.*, 2008). Diversos estudos de polinização envolvendo abelhas oligoléticas como visitantes florais indicam que essas especialistas são os principais polinizadores (Cane *et al.*, 1985; Neff e Rozen, 1995; Schlindwein e Wittmann, 1995; 1997a; b; Schlindwein e Martins, 2000; Larsson, 2005; Schlindwein *et al.*, 2005), mas em alguns casos abelhas oligoléticas não contribuem significativamente para a polinização cruzada (Linsley *et al.*, 1963a; b; 1964; Barrows *et al.*, 1976; Grant e Hurd, 1979; Grant e Grant, 1979).

*Ceblurgus longipalpis* Urban & Moure 1993 é a única espécie da subfamília Rophitinae (Halictidae) no Brasil e, até o momento, foi registrada exclusivamente em flores de *Cordia leucocephala* Moric. (Cordiaceae), na Caatinga. Rophitinae abrange 208 espécies de abelhas predominantemente oligoléticas, distribuídas principalmente na África e região Holártica (Michener, 2007; Patiny *et al.*, 2007). Características especiais para a coleta de pólen, como pilosidade facial, cerdas não ramificadas e pêlos longos e plumosos nos segmentos basais das peças bucais (premento, gáleas, e primeiro e segundo palpos labiais) foram observadas em outras espécies de Rophitinae (Eickwort *et al.*, 1986; Müller, 1996b; Rozen, 1997).

O gênero cosmopolita *Cordia* (Cordiaceae) compreende cerca de 350 espécies (Miller, 2001; Judd *et al.*, 2007), geralmente heterostílicas (Gibbs e Taroda, 1983; Taroda e Gibbs, 1986; 1987). Plantas heterostílicas são polinizadas predominantemente por insetos (Ganders, 1979) e são relacionadas a uma grande variedade de polinizadores (Barrett, 1978; Schlindwein e Medeiros, 2006). Estudos recentes, no entanto, mostraram que a interação com

os polinizadores pode ser muito estreita (Alves-dos-Santos e Wittmann, 1999; 2000; Alves-dos-Santos, 2002; 2003).

Neste estudo, foi investigada a ecologia da polinização de *Cordia leucocephala* e perguntou-se: 1) Quais caracteres florais diferem entre as morfas longistilas e brevistilas? 2) Abelhas de *Ceblurgus longipalpis* são polinizadores efetivos e adaptados à coleta do pólen em flores de *C. leucocephala*? 3) Existe uma dependência reprodutiva mútua entre os parceiros? 4) Qual a magnitude do fluxo polínico intra e intermorfa na interação *Cordia-Ceblurgus*?

### **5.3. Material e Métodos**

#### **5.3.1. Local de estudo**

O estudo foi realizado entre os meses de março e junho de 2007 e 2008 na “Fazenda Gentio”, situada nos municípios de Pedra, Pernambuco, Nordeste do Brasil (8°65'35.54''S, 36°87'30.2''W; 550 m de altitude). A fazenda está inserida no domínio da Caatinga, uma floresta tropical seca, dominada por árvores e arbustos caducifólios e plantas suculentas. A vegetação arbórea do local é composta por árvores nativas e principalmente pela forrageira exógena *Prosopis juliflora*, enquanto um efêmero estrato herbáceo ocorre durante a estação chuvosa irregular. A estação meteorológica de Pedra indica uma temperatura média anual de 22,9° e precipitação acumulada de 550 mm, com picos de precipitação entre fevereiro e junho (CPTEC, 2009).

#### **5.3.2. Espécie estudada**

*Cordia leucocephala* é um arbusto endêmico da Caatinga (Melo e Sales, 2005) que floresce durante a estação chuvosa, principalmente entre fevereiro e abril (Machado, 1990). Suas inflorescências globosas produzem até 20 flores. As flores brancas e infundibuliformes são distílicas e o estigma possui quatro apêndices (Melo e Sales, 2005). Em Alagoinha, Pernambuco, Brasil, Machado (1990) encontrou diferenças no comprimento dos estiletos e estames, assim como no tamanho dos grãos de pólen, entre as morfas brevi e longistila de *Co. leucocephala*. Experimentos de polinização controlada, no entanto, não evidenciaram claramente o sistema reprodutivo. Polinização cruzada manual legítima resultou apenas na formação de um fruto, enquanto flores acessíveis a polinizadores não formaram frutos.

### **5.3.3. Morfologia floral e antese**

Cinquenta botões florais de cada morfa foram ensacados para descrever a antese do momento da abertura floral até sua abscisão. Foram registrados o tempo de abertura floral, deiscência da antera, receptividade estigmática, viabilidade polínica, disponibilidade de néctar e padrão de floração. A receptividade estigmática foi determinada com auxílio de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 %) e Permanganato de Potássio (0,1 %). Para a determinação da viabilidade polínica, grãos de 10 flores brevistilas e 10 longistilas foram removidos de anteras fixadas em FAA e transferidos para lâminas microscópicas com solução de Carmim Acético. Os primeiros 300 grãos de pólen por flor foram contados no microscópio para determinar a taxa de grãos corados (Dafni *et al.*, 2005). Lâminas de microscópio foram preparadas com grãos de pólen frescos de 10 flores de cada morfa. Os grãos foram retirados com um pequeno pedaço de gelatina glicerinada, depositados nas lâminas, que foram cobertas com lamínulas e seladas com parafina. Os grãos foram medidos e a ornamentação da exina foi analisada no microscópio. O diâmetro dos primeiros 15 grãos foi medido na sua região equatorial em 10 flores de cada morfa. Grãos de pólen inviáveis foram desconsiderados.

Volume e concentração de néctar foram medidas com microcapilares de 0,5 µl (Brand) e refratômetro de bolso (Atago), respectivamente. Medidas foram feitas no final da antese, utilizando 38 flores previamente ensacadas de 38 indivíduos de cada morfa. Em 15 flores brevi e longistilas de diferentes indivíduos (n = 15 para cada morfa), foram medidos o diâmetro da abertura floral e comprimento da corola, cálice, estames, estigma e lóbulos estigmáticos, usando um paquímetro digital (Stainless Digimess). A diferença entre as papilas estigmáticas de cada morfa foi observada em fotos de microscopia eletrônica de varredura. A taxa de indivíduos brevi e longistila na população foi determinada em 100 plantas.

### **5.3.4. Sistema reprodutivo**

Para determinar o sistema reprodutivo de *Co. leucocephala* os seguintes experimentos de polinização controlada foram realizados em ambas morfais: 1) autopolinização espontânea, flores ensacadas permanentemente e não manipuladas; 2) autopolinização manual, flores ensacadas foram polinizadas manualmente com o próprio pólen; 3) polinização cruzada manual intra e inter-morfa, flores foram polinizadas com pólen de diferentes indivíduos, a pelo menos 1 km de distância e 4) polinização aberta, flores expostas aos polinizadores em condições naturais (controle). Para cada tratamento, e para cada morfa, foram utilizados 40

botões florais ensacados antes da antese, com a exceção dos 60 botões expostos à polinização natural. Os frutos maduros foram coletados e as suas sementes foram contadas.

A razão pólen/óvulo foi determinada a partir de 10 botões florais, coletados aleatoriamente em 10 indivíduos de cada morfa. Todos os grãos de pólen foram removidos das anteras, corados com fucsina e contados na Lupa (Zeiss Stemi SV8). O ovário das flores foi dissecado e os óvulos contados com o auxílio da lupa. A média e o desvio padrão da razão P/O de *Co. leucocephala* foram determinados (Dafni *et al.*, 2005).

### **5.3.5. Visitantes florais e polinizadores efetivos**

Os visitantes florais foram coletados em flores *brevi* e *longistila* com redes entomológicas, montados, identificados e armazenados na Coleção Entomológica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Dados de coleta foram incluídos no banco de dados do grupo de trabalho. Exsiccatas das plantas foram armazenadas no Herbário Geraldo Mariz UPE, Recife.

A frequência de visitantes foi determinada em três indivíduos *longi* e *brevistila* durante três dias não consecutivos. Em cada indivíduo, 10 flores foram monitoradas das 08:00h às 14:00h, o que corresponde a um total de 18 horas de observação direta. Durante as visitas florais foram observados o comportamento dos visitantes, e os recursos florais por eles coletados. Para determinar os polinizadores efetivos, foram considerados o comportamento das abelhas durante as visitas florais, sua frequência relativa, contato com as partes reprodutivas e vôos efetuados entre indivíduos co-específico.

A frequência relativa de grãos de pólen de flores *brevi* e *longistilas* de *Cordia leucocephala* nas escopas do metasoma e pernas posteriores dos visitantes florais foi mensurada para determinar a fidelidade floral. Cargas polínicas uniformes foram consideradas como indicativo de constância floral. A superfície corporal de seis indivíduos foi examinada em busca de pólen. Amostras foram retiradas com pequenos pedaços de gelatina glicerinada, transferidas para lâminas de microscópio, montadas com lamínulas e vedadas com parafina. Cargas polínicas foram analisadas a partir da contagem dos primeiros 100 grãos de pólen em cada amostra. Os grãos de pólen de flores *brevi* e *longistilas* de *Co. leucocephala* e de outras plantas, aderidos a cada parte do corpo dos visitantes florais, foram contados no microscópio. Os grãos de pólen aderidos às diferentes partes do corpo dos polinizadores foram analisados e documentados com SEM.

Como medida de fluxo legítimo e ilegítimo de pólen, foi contado o número de grãos de pólen aderidos aos estigmas de flores brevi e longistilas de *Co. leucocephala*. Os estigmas de 10 flores de cada morfa foram removidos no fim da antese. Além do mais, para medir o fluxo polínico gerado por apenas uma visita floral, foram permitidas visitas únicas de machos e fêmeas de *Cebalurgus longipalpis* a flores recentemente desensacadas (n=10 para cada sexo). Os estigmas removidos após as visitas únicas e no fim da antese foram depositados em lâminas de microscópio, contendo gelatina glicerinada com fucsina e vedadas com lamínulas. A preparação das lâminas foi realizada ainda no campo, e o material utilizado foi mantido em caixa de isopor com gelo. Grãos de pólen de flores brevi e longistila de *Co. leucocephala* e outras plantas foram então contados no microscópio.

### **5.3.6. Análises estatísticas**

O teste *t* (amostras independentes) foi utilizado para verificar diferenças entre as médias das seguintes medidas nas morfais brevi e longistila: comprimento do estigma e estame, volume de néctar, número de grãos de pólen e fluxo de pólen legítimo e ilegítimo. Testes *t* (amostras dependentes) foram utilizados para comparar a média de fluxo polínico legítimo e ilegítimo em flores da mesma morfa e para verificar se grãos de pólen das diferentes morfais foram depositados em partes específicas do corpo dos polinizadores. A normalidade das amostras foi verificada a partir de testes de Shapiro–Wilks (Zar, 1999).

## **5.4. Resultados**

### **5.4.1. Morfologia floral e antese**

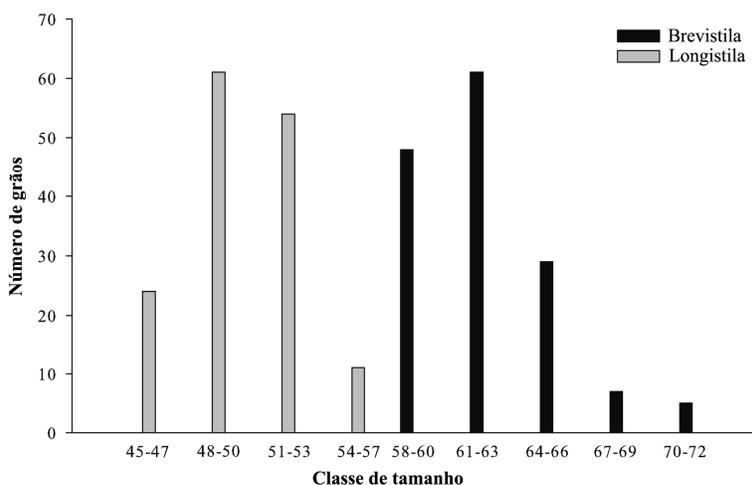
*Cordia leucocephala* apresenta flores distílicas que variam em pelo menos sete caracteres (Tabela 1). Os grãos de pólen de flores brevistilas são maiores (diâmetro médio de 62,2 µm) que os de flores longistilas (50,1 µm), não sendo registrada sobreposição no tamanho entre os dois tipos de grãos (Fig. 1). Flores brevistilas produzem, em média, menos grãos (3361) do que as longistilas (5223) ( $t = 14,74$ ;  $g.l = 18$ ;  $p = 0,0001$ ). Os lobos estigmáticos da morfa brevistila são mais curtos do que os da morfa longistila, enquanto as papilas estigmáticas de flores brevistilas são menores (5,5 a 10,1 µm) do que as de longistilas (13 a 20,2 µm) (Fig. 2 a, b). Os estames são dispostos em três níveis que são mais curtos em flores longistilas ( $6,1 \pm 1,1$ ;  $8,2 \pm 1,4$ ;  $9,7 \pm 1,3$  mm, n=15) do que em flores brevistilas ( $9,4 \pm 0,8$ ;  $11,6 \pm 1,1$ ;  $13,4 \pm 1,1$  mm, n = 15). A base dos filetes das duas morfais, e sua continuação

com as pétalas fusionadas, apresenta densos tricomas, delimitando cinco canais que levam ao disco nectarífero na base do ovário (Fig. 2 c).

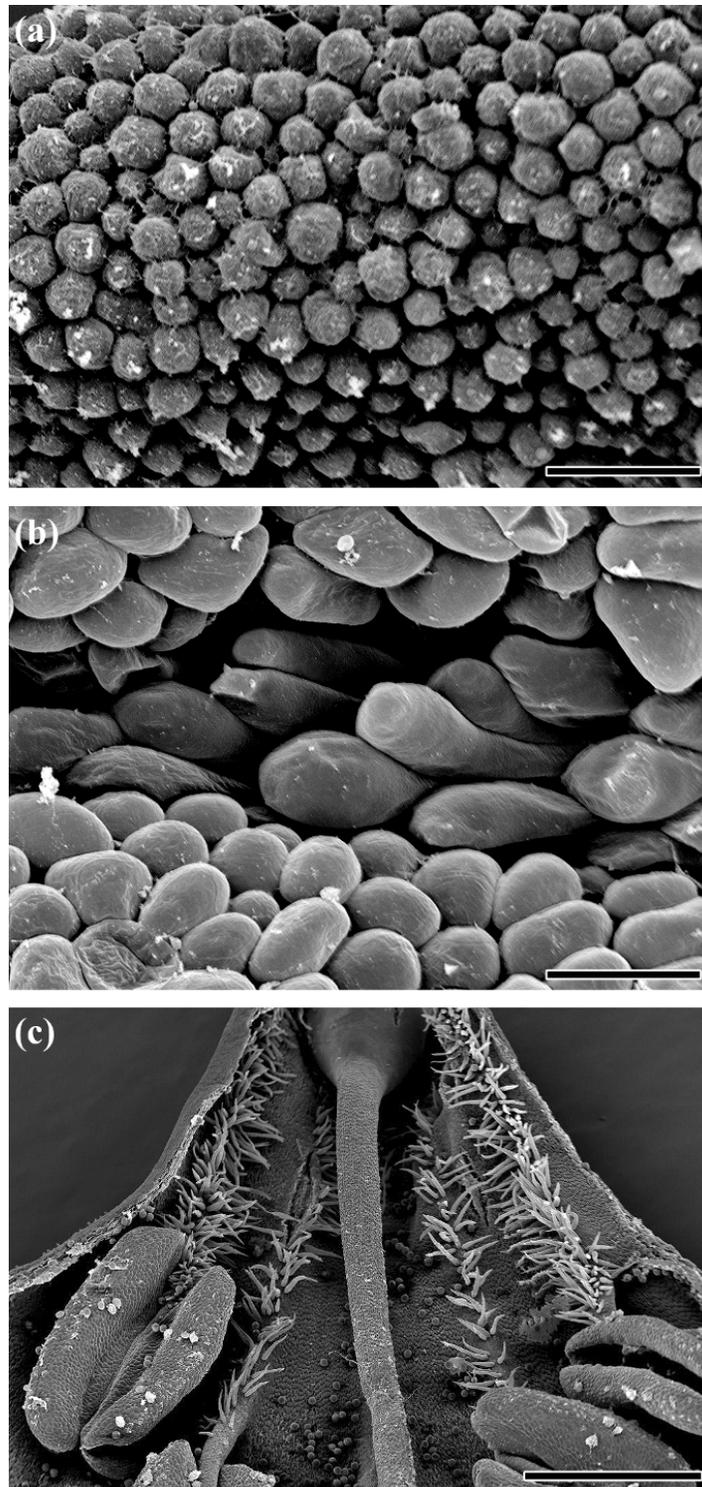
As flores de *C. leucocephala* abrem simultaneamente, entre 07:10 e 08:30 h, de acordo com as condições do tempo e caem entre 14:45 e 17:00 h. No início da abertura floral os estigmas já estão receptivos e as anteras deiscentes. A viabilidade polínica foi alta e similar em flores brevistilas (média e desvio padrão, 96,5%  $\pm$  1,5) e longistilas (95,2%  $\pm$  1,9). Apesar de ambas as morfais produzirem pouco néctar, flores brevistilas produzem, em média, mais néctar (0,16  $\pm$  0,05  $\mu$ l, n = 38) do que as longistilas (0,09  $\pm$  0,03  $\mu$ l, n = 38) (t = 6,83; g.l = 74; p < 0,0001).

**Tabela 1.** Caracteres florais em morfais brevis e longistilas de *Cordia leucocephala*.

Características florais	Morfa Floral	
	Brevistila (x $\pm$ DP; n)	Longistila (x $\pm$ DP; n)
Comprimento do estilete (cm)	6 $\pm$ 0,3; 10	14,2 $\pm$ 1,1, 10
Comprimento dos lobos estigmáticos (cm)	1,33 $\pm$ 0,16; 15	1,81 $\pm$ 0,2
Papilas estigmáticas ( $\mu$ m)	5,5 a 10	13 a 20,2
Comprimento dos filetes 1º, 2º e 3º nível (mm)	9,4 $\pm$ 0,8, 11,6 $\pm$ 1,1, 13,4 $\pm$ 1,1; 15	6,1 $\pm$ 1,1, 8,2 $\pm$ 1,4, 9,7 $\pm$ 1,3; 15
Número de grãos de pólen por flor	3361 $\pm$ 211; 10	5223 $\pm$ 339; 10
Tamanho do pólen (eixo equatorial, $\mu$ m)	62,2 $\pm$ 2,1; 150	50,1 $\pm$ 1,7; 150
Quantidade de néctar ( $\mu$ l)	0,16 $\pm$ 0,05; 38	0,09 $\pm$ 0,03; 38



**Fig. 1** Tamanho de grãos de pólen ( $\mu$ m) de flores brevistilas (n = 150) e longistilas (n = 150) de *Cordia leucocephala*.



**Fig. 2** Microscopia eletrônica de varredura das papilas estigmáticas de flores brevistilas (a) e longistilas (b). Pêlos na base dos filetes de flores longistilas de *Cordia leucocephala*, formando cinco canais onde as abelhas inserem as línguas (c). Barras indicam 25  $\mu$ m (a, b) e 1 mm (c).

#### 5.4.2. Sistema reprodutivo

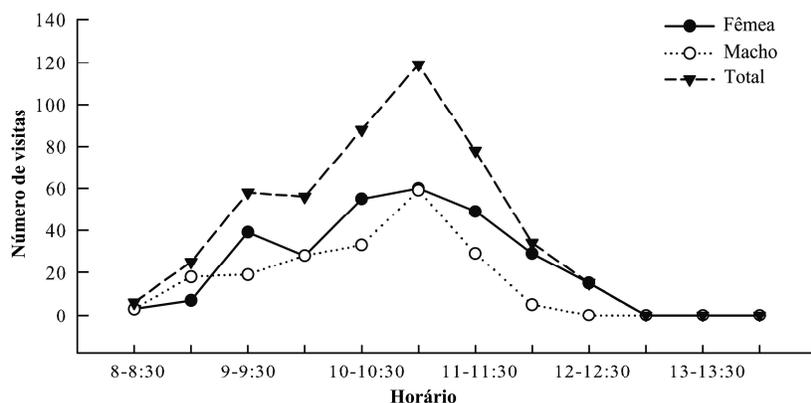
Experimentos de polinização controlada mostraram que flores de *Cordia leucocephala* são auto-incompatíveis (Tabela 2). Flores que sofreram autopolinização manual e polinização cruzada manual intramorfa produziram apenas um fruto cada. Apenas flores expostas à polinização natural (controle) e aquelas que sofreram polinização cruzada manual intermorfa formaram frutos substancialmente. A formação de frutos nesses dois últimos grupos foi similar (tabela 2). Os ovários de *Cordia leucocephala* produzem apenas quatro óvulos ( $n = 10$  para cada morfa), mas todos os frutos apenas uma semente. A razão pólen/óvulo foi de  $840,2 \pm 52,8$  ( $n = 10$ ) em flores brevistilas e  $1305,7 \pm 84,7$  ( $n = 10$ ) em flores longistilas.

**Tabela 2** Experimentos de polinização controlada em *Cordia leucocephala*. Nos tratamentos de autopolinização manual, autopolinização espontânea e polinização cruzada manual, botões florais foram ensacados antes da abertura floral. Flores expostas (controle) foram marcadas e visitadas naturalmente. (B = flores brevistilas, L = flores longistilas, <sup>a</sup> receptor de pólen, <sup>b</sup> doador de pólen).

Tratamento de polinização	Morfa floral	Número de flores	Número de frutos (n)	Taxa de frutificação (%)
Autopolinização espontânea	B	40	1	2,5
	L	40	0	0
Autopolinização manual	B	40	1	2,5
	L	40	0	0
Polinização cruzada manual	L <sup>a</sup> X L <sup>b</sup>	40	0	0
	B <sup>a</sup> X B <sup>b</sup>	40	1	2,5
	B <sup>a</sup> X L <sup>b</sup>	40	14	35
	L <sup>a</sup> X B <sup>b</sup>	40	9	22,5
Flores expostas (controle)	B	60	25	41
	L	60	12	20

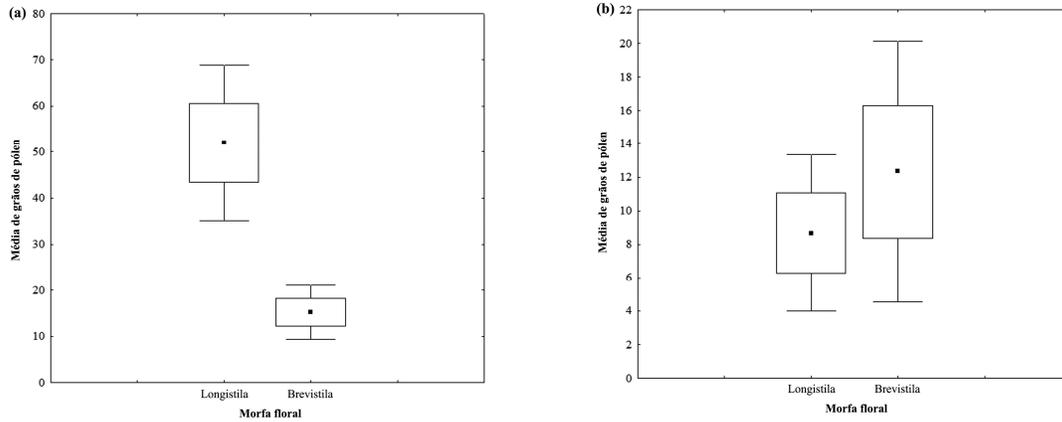
#### 5.4.3. Visitantes florais e polinizadores efetivos

Machos e fêmeas de *Ceblurgus longipalpis* foram praticamente os únicos visitantes florais de *Cordia leucocephala*. Durante todo o período de trabalho de campo, foram observadas apenas visitas esporádicas de operárias de *Apis mellifera* e uma única visita da borboleta *Phoebes sennae* (Pieridae). Visita a flores de *Cordia leucocephala* iniciaram-se logo após a abertura floral, mas foram mais frequentes entre 10:00 e 12:00 h (Fig. 3). Fêmeas foram visitantes florais mais frequentes (média de 9,5 visitas por flor,  $n = 60$  flores) do que machos (6,4 visitas por flor,  $n = 60$ ). No entanto, os machos iniciaram as visitas às flores cerca de 30 minutos antes das fêmeas (Fig. 3).



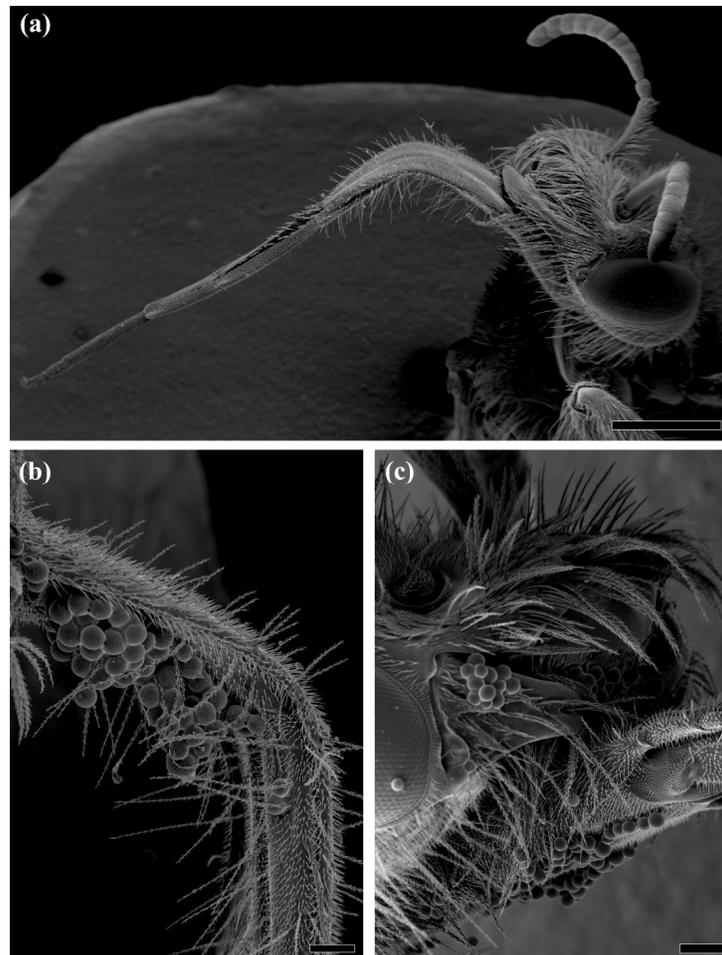
**Fig. 3** Freqüência de visitas florais de machos e fêmeas de *Ceblurgus longipalpis* em *Cordia leucocephala*. Observações foram realizadas em três dias não consecutivos da abertura à abscisão floral.

A análise de grãos de pólen de *Co. leucocephala* na superfície do corpo de fêmeas de *Ce. longipalpis*, após visitas florais, mostrou que os grãos aderem principalmente a quatro regiões: a) peças bucais – parte ventral do primeiro e segundo segmento dos palpos labiais e premento; b) parte anterior do clipeo, labro e mandíbulas; c) escopa ventral do metasoma e d) escopa do fêmur e tíbia das pernas posteriores. Palpos labiais e premento apresentaram, em média, 77,4% grãos de pólen de flores longistilas ( $52 \pm 21,1$  grãos) e apenas 22,6% de flores brevistilas ( $15,2 \pm 7,3$ ) ( $t = 4,09$ ;  $g.l = 5$ ;  $p = 0,009$ ; Fig. 4 a). Clipeo, labro e mandíbulas, por sua vez, apresentaram pólen de flores longi e brevistilas em número similares (respectivamente 41% e 59%;  $p = 0,5$ ;  $t = 0,7$ ;  $d.f = 5$ ; Fig. 4 b). O primeiro e segundo segmentos dos palpos labiais de *Ce. longipalpis* possuem pêlos longos e plumosos (300-400 $\mu$ m de comprimento), distribuídos espaçadamente na superfície ventral (distância de 100-200  $\mu$ m entre os pêlos) (Fig. 5 a). A superfície entre os pêlos é provida de cerdas curtas (aproximadamente 10  $\mu$ m) e densas (cerca de 10  $\mu$ m entre elas). Os grãos de pólen encontrados nos segmentos basais dos palpos labiais ficam aderidos entre os longos pêlos plumosos e as cerdas (Fig. 5 b). Na superfície ventral do premento encontram-se apenas as cerdas curtas, enquanto o clipeo e as mandíbulas possuem pêlos longos e plumosos, formando uma “franja” (Fig. 5 c). Machos de *Ce. longipalpis* não apresentam pêlos na superfície ventral dos segmentos basais dos palpos labiais e, nos indivíduos coletados, pouco ou nenhum grão de pólen foi encontrado.

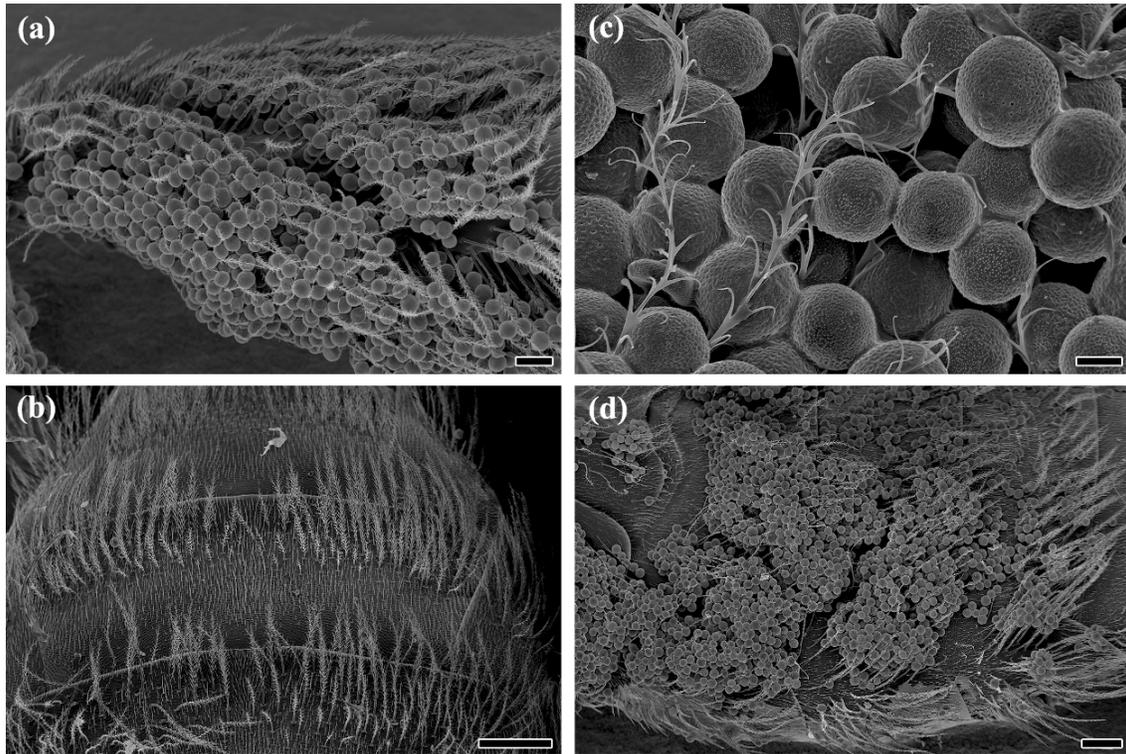


**Fig. 4** Média de grãos de pólen de flores brevi e longistilas de *Cordia leucocephala* nas peças bucais – parte ventral do primeiro e segundo segmentos dos palpos labiais e premento (a) e parte anterior do cípeo, labro e mandíbulas (b) de *Cebalurgus longipalpis*. ■ Média, □ Média ± EP e ▭ Média ± 1,96\*EP.

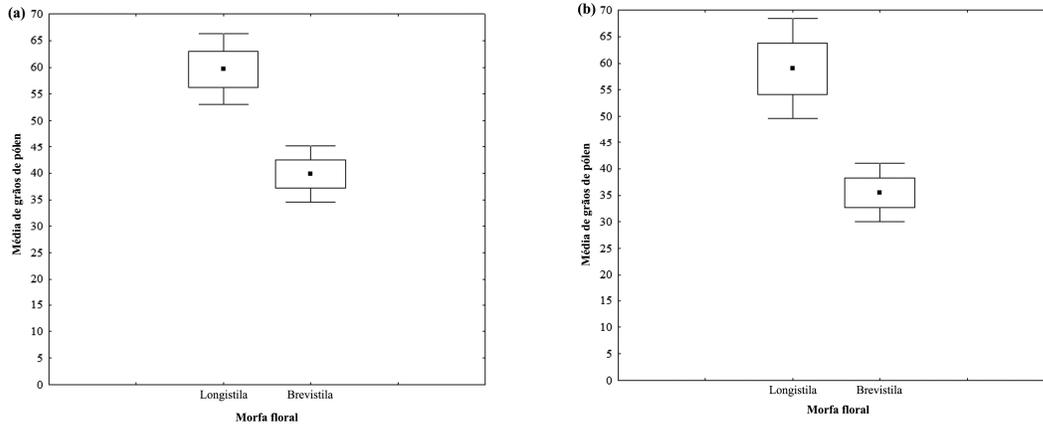
**Fig. 5** Pêlos especializados de *Cebalurgus longipalpis* para coleta de grãos de pólen de flores de *Cordia leucocephala*. Visão geral da cabeça e língua de *Cebalurgus longipalpis* (a). Grãos de pólen aderidos aos pêlos plumosos e cerdas dos segmentos basais dos palpos labiais (b) e aos pêlos longos e plumosos no cípeo e mandíbulas, formando uma franja (c). Barras indicam 1 mm (a) e 100 µm (b, c).



A escopa das fêmeas é formada por pêlos longos e plumosos no fêmur e tíbia das pernas posteriores (Fig. 6 a) e nos esternitos do metasoma (Fig. 6 b). A carga polínica das escopas apresentou pólen exclusivamente de *Cordia leucocephala* (Fig. 6 c, d). As escopas do metasoma e das pernas posteriores continham mais grãos de flores longistilas do que de brevistilas e ambas em proporções similares (respectivamente 62,4% e 60% de grãos de flores longistilas na escopa do metasoma e pernas posteriores e 37,6% e 40% de flores brevistilas, n = 6) (Fig. 7 a, b).



**Fig. 6** Pêlos especializados de *Ceblurgus longipalpis* para armazenar e transportar grãos de pólen de flores de *Cordia leucocephala*. Pêlos longos, densos e plumosos no fêmur e tíbia posterior (a) e no esternitos do metasoma (b). Detalhe da escopa no fêmur e tíbia posterior (c) e nos esternitos do metasoma (d) cheias de grãos de pólen de flores brevi e longistilas. Barras indicam 100  $\mu\text{m}$  (a), 300  $\mu\text{m}$  (b), 20  $\mu\text{m}$  (c), e 200  $\mu\text{m}$  (d).

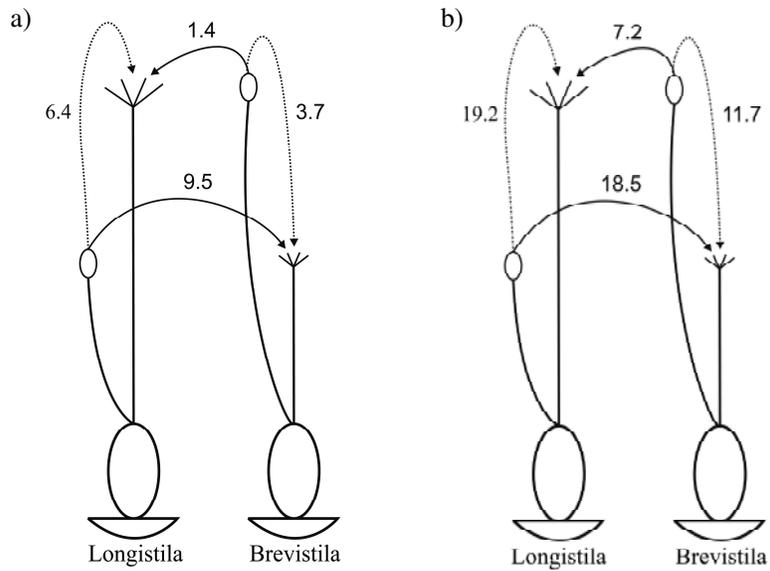


**Fig. 7** Média de grãos de pólen de flores brevi e longistilas de *Cordia leucocephala* nas escopas das pernas posteriores (a) e do metasoma (b) de *Ceblurgus longipalpis*. A diferença entre a média de grãos de pólen de flores brevi e longistilas na escopa do metasoma ( $t = 5,01$ ;  $d.f = 5$ ;  $p = 0,004$ ) e das pernas posteriores ( $t = 5,11$ ;  $d.f = 5$ ;  $p = 0,0037$ ) foi significativa. ■ Média, □ Média  $\pm$  EP e ┌┐ Média  $\pm$  1.96\*EP.

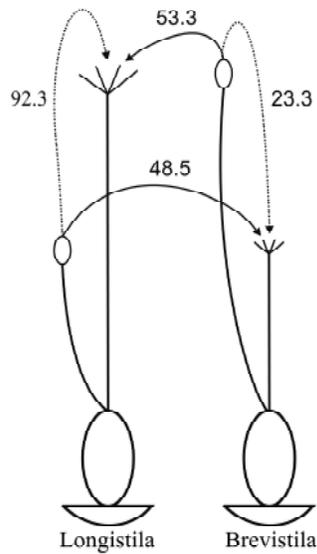
#### 5.4.4. Fluxo polínico

Durante uma visita floral única, indivíduos de *Ceblurgus longipalpis* depositaram mais pólen de flores longistilas no estigma de ambas as morfais florais. As fêmeas depositaram, em média, quase duas vezes mais grãos em estigmas de flores brevistilas (média de 30,5;  $n = 10$ ) e longistilas (26,7;  $n = 10$ ) do que os machos (respectivamente, 13,4 e 7,7;  $n = 10$ ) (Fig. 8 a, b). A deposição de pólen de anteras do nível longo (flores brevistilas) em estigmas de flores longistilas (polinização legítima) foi menor do que vice e versa (polinização legítima, nível baixo).

No fim da antese, apenas pólen co-específico foi depositado em estigmas de flores brevi e longistilas de *Cordia leucocephala*. Grãos das morfais brevi e longistila foram registrados no estigma de ambas as morfais. Estigmas de flores longistilas receberam, em média,  $145,6 \pm 64,9$  grãos de pólen ( $n = 10$ ) e aquelas de flores brevistilas  $71,8 \pm 26,5$  ( $n = 10$ ) (Fig. 9). O fluxo polínico legítimo (intermorfa) foi similar em ambas as morfais, sendo  $53,3 \pm 44$  grãos depositados em estigmas longos ( $n = 10$ ) e  $48,5 \pm 20,7$  em estigmas curtos ( $n = 10$ ) ( $t = 0,3$ ;  $g.l = 18$ ;  $p = 0,75$ ). O fluxo polínico ilegítimo (intramorfa), no entanto, foi maior que o fluxo legítimo em flores longistilas ( $t = 2,2$ ;  $g.l = 9$ ;  $p < 0,05$ ) e menor que legítimo em flores brevistilas ( $t = 3,7$ ;  $g.l = 9$ ;  $p = 0,005$ ). O fluxo polínico ilegítimo em flores longistilas foi muito maior do que aquele de flores brevistilas ( $t = 4,7$ ;  $g.l = 18$ ;  $p = 0,0001$ ).



**Fig. 8** Número médio de grãos de pólen de *Cordia leucocephala* depositados nos estigmas em visitas únicas de *Ceblurgus longipalpis*; (a) machos (n = 10), (b) fêmeas (n = 10). O fluxo polínico intermorfos (legítimo) é representado por linhas sólidas, enquanto o fluxo polínico intramorfos ilegítimo é representado por linhas pontilhadas.



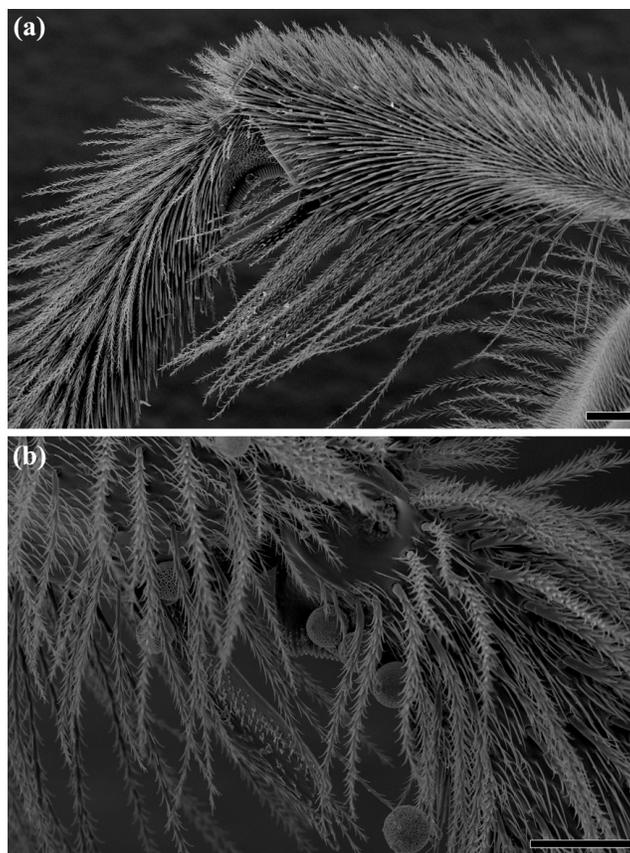
**Fig. 9** Número médio de grãos de pólen de *Cordia leucocephala* depositados por visitantes florais nos estigmas de flores brevi e longistilas no fim da antese. O fluxo polínico intermorfos (legítimo) é representado por linhas sólidas, enquanto o fluxo polínico intramorfos ilegítimo é representado por linhas pontilhadas.

Fêmeas de *Ce. longipalpis* forragearam nas flores em busca de néctar e pólen (Fig. 10 a, b). Durante a bebida de néctar, foram observados movimentos de contração e retração dos segmentos abdominais repetidamente. Os grãos de pólen foram coletados com as peças bucais. Após uma série de visitas, fêmeas limpavam a face e as peças bucais com as pernas anteriores e então transferiram os grãos para as escopas. A tíbia e fêmur das pernas anteriores das fêmeas apresentam uma “franja” de pêlos extremamente longos e plumosos ao longo de sua borda ventral (Fig. 11 a). Grãos aderidos a esses pêlos, principalmente nas proximidades do estrigilo (Fig. 11 b), foram encontrados em diversas fêmeas.

Durante a patrulha nas flores, à procura de fêmeas, os machos geralmente visitaram flores para coleta de néctar. Já no fim da antese floral de *Co. leucocephala*, os machos procuraram flores longistilas para dormir e agarraram-se aos estigmas longos com suas mandíbulas, o que evitou a queda das flores ocupadas.



**Fig. 10** Fêmeas de *Ceblurgus longipalpis* coletando pólen de *Cordia leucocephala* e os transferindo para a escopa das pernas posteriores e do metasoma (a). Fêmea de *Ce. longipalpis* com escopas repletas de pólen *Co. leucocephala* (b).



**Fig. 11** Pernas anteriores de fêmeas de *Ceblurgus longipalpis* com uma franja de pêlos longos e plumosos ao longo da borda ventral (a) e grãos de pólen de *Cordia leucocephala* aderidos aos pêlos ao redor do estrigilo (b). Barras = 100 µm.

## 5.5. Discussão

### 5.5.1. Dependência reprodutiva mútua entre *Cordia leucocephala* e *Ceblurgus longipalpis*

Nossos resultados mostram que os parceiros *Co. leucocephala* e *Ce. longipalpis* dependem reprodutivamente um do outro. As flores de *Co. leucocephala* foram visitadas quase que exclusivamente por fêmeas e machos de *Ce. longipalpis*. Isso também foi observado em diversos levantamentos de abelhas e plantas melíferas conduzidos em outras áreas de Caatinga como, Sertânia e Buíque (Pernambuco) (Schlindwein *et al.*, não publicado), Serra Branca (Schlindwein não publicado) e São João do Cariri (Paraíba) (Aguilar e Martins, 1994; Aguilar *et al.*, 1995) e Casa Nova (Bahia) (Martins, 1994), onde essas abelhas também foram os únicos visitantes florais. Conseqüentemente, na ausência dessa espécie de abelha, as flores auto-incompatíveis de *Co. leucocephala* não devem produzir frutos. Todas as informações da relação de *Ceblurgus longipalpis* com sua planta hospedeira, por sua vez,

também apontam *Co. leucocephala* como fonte exclusiva de pólen, mesmo na presença de plantas co-genéricas de *Co. globosa*, indicando um dos raros casos de monoletia em abelhas. Isso quer dizer que, na ausência dessa planta, a abelha *Ce. longipalpis* talvez não sobreviva. Esse tipo de interação, onde um polinizador depende de única espécie de planta e vice e versa, é raro. Seria interessante investigar se essa abelha também é o único polinizador de *Co. leucocephala* em outras áreas de ocorrência dos parceiros.

As flores tubulares, brancas e vistosas de *Co. leucocephala* deveriam atrair uma grande variedade de polinizadores. No entanto, as anteras ficam escondidas na base do tubo floral, o que dificulta a coleta de pólen por visitantes florais generalistas. Apenas abelhas com peças bucais longas e especializadas são capazes de coletar o pólen de difícil acesso. A coleta de pólen com as peças bucais em flores tubulares não é muito comum, mas surgiu em diferentes linhagens, sempre envolvendo adaptações específicas de diferentes espécies de abelhas (Eickwort *et al.*, 1986; Müller, 1995; 1996b; 2006; Alves-dos-Santos e Wittmann, 1999; Müller e Kuhlmann, 2003; Krenn *et al.*, 2005). Em *Ce. longipalpis*, os pêlos longos e plumosos nos segmentos basais dos palpos labiais são adaptações para a coleta de pólen, principalmente das anteras de nível baixo de flores longistilas. As análises de pólen mostram, portanto, que flores brevistilas são polinizadas exclusivamente por grãos aderidos a essa pilosidade dos palpos labiais.

Várias características envolvidas na associação entre *Ce. longipalpis* e *Co. leucocephala* remetem àquelas da associação entre *Ancyloscelis gigas* e *Eichornia azurea* (Alves-dos-Santos e Wittmann, 1999; 2000; Alves-dos-Santos, 2002; 2003). Nos dois casos, as espécies vegetais envolvidas apresentam auto-incompatibilidade heteromórfica (tristilia no caso de *Eichornia*), flores tubulares com corola longa e estreita, e anteras de difícil acesso a visitantes não especializados. Em ambos os casos existe apenas uma espécie de abelha polinizadora especializada, estritamente oligoléticas (provavelmente monoléticas). Ambas as abelhas apresentam peças bucais extremamente longas, providas com pêlos não usuais para coleta de pólen, adaptados especialmente para remover o pólen das flores com anteras de nível baixo (longistilas). Além do mais, nesses dois sistemas, visitantes florais competindo por recursos são praticamente ausentes. Em locais onde *Ancyloscelis gigas* não ocorre, populações de *E. azurea* sofreram quebra de heterostilia (Alves-dos-Santos, 2002). Isso também pode ser esperado na associação entre *Ce. longipalpis* e *Co. leucocephala* caso a abelha não seja substituída por outro polinizador especializado com peças bucais longas para garantir a polinização de flores brevistilas.

Além de permitir a coleta de pólen de difícil acesso, as peças bucais longas de *Ce. longipalpis* também são utilizadas para a coleta de néctar na base do tubo de flores de *Co. leucocephala*. Outros visitantes florais com peças bucais compridas, como borboletas, abelhas Euglossini, Centridini e Eucerini, ou até mesmo beija-flores, também alcançariam os nectários na base das flores. A diminuta quantidade de néctar, no entanto, torna as flores de *Co. leucocephala* pouco atrativas para polinizadores de médio a grande porte. Concomitantemente, essa pequena disponibilidade de néctar por flor parece ser suficiente para suprir as necessidades energéticas e de alimentação larval de *Ce. longipalpis*, uma vez que não foram observadas visitas adicionais em flores ricas em néctar.

A associação obrigatória entre *Ce. longipalpis* e *Co. leucocephala* parece ser isolada em um contexto filogenético, uma vez que não existem registros de qualquer espécie relacionada aos parceiros que também estejam envolvidas em interações planta-polinizador. *Cordia* é um gênero diverso e pantropical que abrange cerca de 350 espécies (Miller, 2001; Judd *et al.*, 2007). As informações disponíveis apontam uma série de sistemas de polinização, incluindo polinização por moscas, borboletas, esfingídeos, abelhas, beija-flores e morcegos (Opler *et al.*, 1975; Machado e Loiola, 2000; Souza-Silva *et al.*, 2001; Darrault e Schlindwein, 2002).

A abelha monotípica *Ce. longipalpis* é a única espécie de Rophitinae no Brasil, e é extremamente isolada geograficamente. As espécies de Rophitinae encontradas mais próximas à abelha da Caatinga *Ceblurgus*, pertencem aos gêneros *Goeletapis* e *Penapis* e ocorrem a cerca de 5000 km de distância, além das Cordilheiras dos Andes, em desertos do Peru e Chile (Rozen, 1997). Juntamente com *Ceblurgus*, esses gêneros constituem a tribo sul-americana Penapini, que são, com apenas cinco espécies, as únicas rophitines da América do Sul (Engel, 2001; Michener, 2007; Patiny *et al.*, 2007). Abelhas dessa tribo divergem da maioria das outras Halictidae pela presença da peça bucal longa, formada pelo alongamento da glossa, palpos labiais e gáleas (Rozen, 1997; Engel, 2001; Michener, 2007). No entanto, em *Goeletapis* e *Penapis*, os pêlos nos palpos labiais são delgados e não plumosos e curtos e inconspícuos, diferentemente dos pêlos longos e plumosos que formam a “escova de pólen” na base dos dois segmentos dos palpos labiais de *Ceblurgus* (Rozen, 1997).

Assim como outras espécies de Rophitinae, as espécies de Penapini também são oligoléticas. As plantas hospedeiras de *Goeletapis peruensis* são *Exodeconus maritimus* (Benth.) D´Arcy e *E. prostratus* (L’Herit) Def. (Solanaceae), enquanto que aquelas de *Penapis penai*, *P. moldenkei* e, provavelmente, *P. toroi*, são duas espécies de *Argylya*

(Bignoniaceae) (Rozen, 1997; Patiny *et al.*, 2007). Todas as três famílias de plantas hospedeiras associadas às abelhas Penapini não são filogeneticamente relacionadas umas as outras e pertencem a diferentes ordens vegetais (Stevens, 2001).

As espécies hospedeiras, no entanto, apresentam flores tubulares longas e estreitas como caracteres em comum (Rozen, 1997). As peças bucais longas e modificadas das Penapini foram provavelmente a condição para a especialização nos recursos florais escondidos, não disponíveis para abelhas com línguas curtas. Nesse caso, devem ter ocorrido mudanças de plantas hospedeiras por uma espécie de abelha ancestral para plantas hospedeiras não relacionadas. A glossa prolongada, envolta por um tubo formado pelos segmentos alongados dos palpos labiais nas poucas espécies de Penapini, é uma adaptação convergente para a coleta de néctar em flores tubulares longas, análoga àquela encontrada nas abelhas de línguas longas (*sensum* Michener, 2007). Estruturas alternativas àquelas de abelhas de línguas longas em línguas de abelhas de línguas curtas foram descritas também em *Niltonia virgilioi*, Colletidae (Laroca e Almeida, 1985; Laroca *et al.*, 1989) e *Dufourea novaeangliae*, Halictidae (Eickwort *et al.*, 1986). Essas abelhas coletam néctar em flores de corolas tubulares longas de *Jacaranda puberula* (Bignoniaceae) e *Pontederia cordata* (Pontederiaceae), respectivamente.

### 5.5.2. Fluxo polínico

Flores brevi e longistilas de *Co. leucocephala* diferem em vários caracteres, três dos quais já tinham sido mencionados por Machado (1990), o que também foi típico em outras espécies do mesmo gênero (Nowicke e Ridgway, 1973; Percival, 1974; Opler *et al.*, 1975; Gibbs e Taroda, 1983; Taroda e Gibbs, 1986; 1987; Nowicke e Miller, 1990). De acordo com Darwin (1877), a posição recíproca das anteras e estigmas em espécies distílicas leva a uma deposição de grãos de pólen de anteras dos dois níveis em posições distintas no corpo dos polinizadores efetivos. Isso aumentaria a polinização cruzada porque os polinizadores iriam contatar os estigmas do nível correspondente com essas partes do corpo, onde os grãos legítimos estariam aderidos. Isso significa que a distílica otimiza o fluxo polínico intermorfos. Em *Co. leucocephala*, a clara separação entre os tamanhos de grãos de pólen de flores brevistilas e longistilas permitiram verificar a origem dos grãos de pólen aderidos a diferentes partes do corpo das abelhas e avaliar fluxo polínico intra e intermorfa na associação entre *Ce. longipalpis* e *Co. leucocephala*.

As análises polínicas revelaram claramente que a pilosidade dos palpos labiais das fêmeas de *Ce. longipalpis* é uma ferramenta específica para coleta de pólen de estames

curtos, enquanto que os grãos de pólen de estames longos aderiram principalmente ao clípeo, mandíbulas e labro, misturado com pólen de estames curtos. Como esperado, as estruturas de transporte de pólen (escopas das pernas posteriores e do metasoma), continham uma mistura de pólen de flores brevi e longistilas semelhante à taxa natural. Isso mostra que fêmeas de *Ce. longipalpis* coletaram pólen de ambos os níveis com a mesma eficiência. A avaliação do fluxo polínico, no entanto, revelou um resultado não esperado: enquanto não houve diferença significativa no fluxo legítimo (polinização cruzada intermorfa) entre flores brevi e longistilas, o fluxo polínico ilegítimo (intramorfa) de anteras de flores longistilas (estames curtos) para estigmas também de flores longistilas foi muito maior do que o fluxo polínico ilegítimo de anteras de flores brevistilas (estames longos) para estigmas de flores brevistilas. Adicionalmente, mais pólen ilegítimo foi depositado em estigmas de flores longistilas e menos pólen ilegítimo em estigmas de flores brevistilas do que pólen legítimo cruzado nos estigmas dos dois níveis. No entanto, não é possível saber se o fluxo polínico ilegítimo é originado por grãos de flores diferentes intramorfa ou grãos da mesma flor (autopolinização). A associação entre *Ceblurgus longipalpis* e *Cordia leucocephala*, portanto, é caracterizada por um fluxo polínico legítimo equilibrado em flores brevi e longistilas, apesar de um fluxo polínico ilegítimo fortemente desequilibrado em ambos os níveis e um maior investimento masculino em flores longistilas quando comparado a flores brevistilas.

Em síntese, a relação extremamente restrita entre *Cordia leucocephala* e seu polinizador efetivo, monolético e altamente especializado *Ceblurgus longipalpis* parece ser resultado de adaptações em ambos os parceiros. No entanto, a ausência de interações de espécies relacionadas filogeneticamente torna a co-evolução um evento pouco provável. Estruturas características, como as incomuns peças bucais longas, também encontradas em outras Penapini, são necessárias para a coleta de néctar nas flores de suas respectivas plantas hospedeiras, não relacionadas filogeneticamente a *Cordia*.

## 5.6. Agradecimentos

Nós agradecemos a Airton T. Carvalho, Carlos Eduardo Pinto e Reislá Oliveira pela ajuda durante a atividade de campo e discussões valiosas, a Hartmut H. Hilger (Freie Universität Berlin, Alemanha) e Gerhard Gottsberger (Universität Ulm, Alemanha) pelo uso do microscópio eletrônico de varredura e a Antônio Tenório pelo suporte logístico no campo. O Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) financiou o estudo (Universal 471401/2006-4) e concedeu bolsas para os autores.

## 5.7. Literatura citada

- Aguiar CML, Martins CF. 1994.** Fenologia e preferência alimentar de *Ceblurgus longipalpis* Urban e Moure, 1993 (Hymenoptera, Halictidae, Dufoureae). *Revista Nordestina de Biologia* **9**: 125-131.
- Aguiar CML, Martins CF, Moura A. 1995.** Recursos florais utilizados por abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em área de Caatinga (São João do Cariri, Paraíba). *Revista Nordestina de Biologia* **10**: 101-117.
- Alves-dos-Santos I. 2002.** Flower-visiting bees and the breakdown of the tristylous breeding system of *Eichornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* **77**: 499-507.
- Alves-dos-Santos I. 2003.** Adaptation of bee proboscides for collecting pollen from Pontederiaceae flowers. In: Melo GAR, Alves-dos-Santos I, eds. *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*. Criciúma: Editora UNESC, 257-263.
- Alves-dos-Santos I, Wittmann D. 1999.** The proboscis of the long-tongued *Ancyloscelis* bees (Anthophoridae/Apoidea), with remarks on flowers visits and pollen collecting with the mouthparts. *Journal of the Kansas Entomological Society* **72**: 277-288.
- Alves-dos-Santos I, Wittmann D. 2000.** Legitimate pollination of the tristylous flowers of *Eichornia azurea* (Pontederiaceae) by *Ancyloscelis gigas* bees (Anthophoridae, Apoidea). *Plant Systematics and Evolution* **223**: 127-137.
- Armbruster WS. 2006.** Evolutionary and ecological aspects of specialized pollination: views from the arctic to the tropics. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. Chicago: The University of Chicago Press, 260-282.
- Barrett SCH. 1978.** Heterostyly in a tropical weed: the reproductive biology of the *Turnera ulmifolia* complex (Turneraceae). *Canadian Journal of Botany* **56**: 1715-1725.
- 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.
- 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. *Plant-pollinator*

- interactions: from specialization to generalization*. Chicago: The University of Chicago Press, 99-121.
- CPTEC. 2009.** Centro de previsão de tempo e estudos climáticos. <http://www.cptec.inpe.br>: Acessado em 26 de outubro de 2009.
- Dafni A, Kevan PG, Husband BC. 2005.** *Practical pollination Ecology*. Cambridge: Enviroquest Ltd.
- Danforth BN, Sipes SD, Fang J, Brady SG. 2006.** The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 15118-15123.
- Darrault RO, Schlindwein C. 2002.** Esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) mo tabuleiro paraibano. Nordeste do Brasil: abundância, riqueza e relação com plantas esfingófilas. *Revista Brasileira de Zoologia* **19**: 429-443.
- Darwin C. 1877.** *The different forms of flowers on plants of the same species*. London: John Murray.
- Eickwort GC, Kukuk PF, Wesley FR. 1986.** The nesting biology of *Dufourea novaeangliae* (Hymenoptera: Halictidae) and the systematic position of the Dufoureae based on behaviour and development. *Journal of the Kansas Entomological Society* **59**: 103-120.
- 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**: 1-259.
- Ganders FR. 1979.** The biology of heterostily. *New Zealand Journal of Botany* **17**: 607-635.
- Gibbs PE, Taroda N. 1983.** Heterostily in the *Cordia alliodora* – *C. trichotoma* complex in Brazil. *Revista Brasileira de Botanica* **6**: 1-10.
- 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.
- Jordano P, Bascompte J, Olesen JM. 2006.** The ecological consequences of complex topology and nested structure in pollination webs. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. Chicago: The University of Chicago Press, 173-199.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2007.** *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.

- Krenn HW, Plant JD, Szucsich NU. 2005.** Mouthparts of flower-visiting insects. *Arthropod, Structure & Development* **34**: 1-40.
- 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.
- Laroça S, Almeida MC. 1985.** Adaptação dos palpos labiais de *Niltonia virgilia* (Hymenoptera, Apoidea, Colletidae) para coleta de néctar em *Jacaranda puberula* (Bignoniaceae), com descrição do macho. *Revista Brasileira de Entomologia* **29**: 289-297.
- Laroça S, Michener CD, Hofmeister M. 1989.** Long mouthparts among “Short-tongued” bees and the fine structure of the labium in *Niltonia* (Hymenoptera, Colletidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **62**: 400-410.
- Larsson M. 2005.** Higher pollinator effectiveness by specialist than generalist flower-visitors of unspecialized *Knautia arvensis* (Dipsacaceae). *Oecologia* **146**: 394-403.
- 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**: 25-58, 26 pls.
- Linsley EG, Macswain JW, Raven PH. 1964.** Comparative behavior of bees and Onagraceae III. *Oenofhera* bees of the Mojave Desert, California. *University of California Publications in Entomology* **33**: 59-98, 53 pls.
- Machado IC. 1990.** *Biologia floral de espécies de Caatinga no município de Alagoinha (PE)*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- Machado IC, Loiola MI. 2000.** Fly pollination and pollinator sharing in two synchronopatric species: *Cordia multispicata* (Boraginaceae) and *Borreria alata* (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botanica* **23**: 305-311.
- Martins CF. 1994.** Comunidade de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) da caatinga e do cerrado com elementos de campo rupestre do estado da Bahia, Brasil. *Revista Nordestina de Biologia* **9**: 225-257.
- Melo JIM, Sales MF. 2005.** Boraginaceae A. Juss. na região de Xingó: Alagoas e Sergipe. *Hoehnea* **32**: 369-380.
- Michener CD. 2007.** *The bees of the world*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.

- Miller JS. 2001.** Two new species of *Cordia* L. (Boraginaceae) from Madagascar. *Adansonia* **23**: 289-295.
- Minckley RL, Roulston TH. 2006.** Incidental mutualisms and pollen specialization among bees. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. Chicago: The University of Chicago Press, 69-98.
- Müller A. 1995.** Morphological specializations in central European bees for the uptake of pollen from flowers with anthers hidden in narrow corolla tubes (Hymenoptera: Apoidea). *Entomologia Generalis* **20**: 43-57.
- Müller A. 1996a.** Host-plant specialization in western palearctic anthidiine bees (Hymenoptera: Apoidea: Megachilidae). *Ecological Monographs* **66**: 235–257.
- Müller A. 1996b.** Convergent evolution of morphological specializations in central European bee and honey wasp species as an adaptation to the uptake of pollen from nototribic flowers (Hymenoptera, Apoidea and Masaridae). *Biological Journal of the Linnean Society* **57**: 235-252.
- Müller A. 2006.** Unusual host plant of *Hoplitis pici*, a bee with hooked bristles on its mouthparts (Hymenoptera: Megachilidae: Osmiini). *European Journal of Entomology* **103**: 497-500.
- Müller A, Kuhlmann M. 2003.** Narrow flower specialization in two European bee species of the genus *Colletes* (Hymenoptera: Apoidea: Colletidae). *European Journal of Entomology* **100**: 631-635.
- 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.
- Nowicke JW, Miller JS. 1990.** Pollen morphology of the Cordioideae (Boraginaceae). *Auxema, Cordia, and Patagonula*. *Plant Systematics and Evolution* **5**: 103-121.
- Nowicke JW, Ridgway JE. 1973.** Pollen studies in the genus *Cordia* (Boraginaceae). *American Journal of Botany* **60**: 584-591.
- Ollerton J, Johnson SD, Hingston AB. 2006.** Geographical variation in diversity and specificity of pollination systems. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. Chicago: The University of Chicago Press, 283-308.
- Opler PA, Baker HG, Frankie GW. 1975.** Reproductive Biology of some Costa Rican *Cordia* species (Boraginaceae). *Biotropica* **7**: 234-247.

- Patiny S, Michez D, Danforth BN. 2007.** Phylogenetic relationships and host-plant evolution within the basal clade of Halictidae (Hymenoptera, Apoidea). *Cladistics* **23**: 1-15.
- Percival M. 1974.** Floral ecology of coastal shrub in Southeast Jamaica. *Biotropica* **6**: 104-129.
- Petanidou T, Potts SM. 2006.** Mutual use of resources in mediterranean plant-pollinator communities: how specialized are pollination webs? In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. Chicago: The University of Chicago Press, 220-244.
- Robertson C. 1925.** Heterotropic bees. *Ecology* **6**: 412-436.
- Rozen JG. 1997.** South American Rophitine bees (Hymenoptera: Rophitinae). *American Museum Novitates* **3206**: 1-27.
- 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 cancelata* (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.** Micro-foraging routes of *Bicolletes pampeana* (Colletidae) and bee-induced pollen presentation in *Cajophora arechavaletae* (Loasaceae). *Botanica Acta* **110**: 177-183.
- Schlindwein C, Wittmann D. 1997b.** Stamen movements in flowers of *Opuntia* (Cactaceae) favour oligolectic pollinators. *Plant Systematics and Evolution* **204**: 179-193.
- 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.
- Sipes SD, Tepedino VJ. 2005.** Pollen-host specificity and evolutionary patterns of host switching in a clade of specialist bees (Apoidea: *Diadasia*). *Biological Journal of the Linnean Society* **86**: 487-505.
- Souza-Silva M, Fontenelle JCR, Martins RP. 2001.** Seasonal abundance and species composition of flower-visiting flies. *Neotropical Entomology* **30**: 351-359.
- Stevens PF. 2001.** Angiosperm Phylogeny Website. Version 9. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acessado em junho de 2008.
- Taroda N, Gibbs PE. 1986.** Studies on the genus *Cordia* L. (Boraginaceae) in Brazil. 1. A new infrageneric classification and conspectus. *Revista Brasileira de Botanica* **9**: 31-42.
- Taroda N, Gibbs PE. 1987.** Studies on the genus *Cordia* L. (Boraginaceae) in Brazil. 2. An outline taxonomic revision of subgenus *Myxa* Taroda. *Hoehnea* **14**: 31-52.
- Vásquez DP, Aizen MA. 2003.** Null model analyses of specialization in plant-pollinator interactions. *Ecology* **84**: 2493-2501.
- Vásquez DP, Aizen MA. 2006.** Community-wide patterns of specialization in plant-pollinator interactions revealed by null models. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. Chicago: The University of Chicago Press, 200-219.
- Wcislo WT, Cane JH. 1996.** Floral resource utilization by solitary bees (Hymenoptera: Apoidea) and exploitation of their stored foods by natural enemies. *Annual Review of Entomology* **41**: 257-286.
- Zar JH. 1999.** *Biostatistical Analysis*. 4<sup>a</sup> edn. New Jersey: Prentice Hall.

## 6. Conclusões e perspectivas futuras

Esta tese de doutorado suscitou contribuições inéditas para o atual conhecimento científico da ecologia cognitiva e da polinização envolvendo abelhas oligoléticas e suas plantas hospedeiras.

Na interação entre a abelha oligolética *Chelostoma rapunculi* e uma de suas plantas hospedeiras, *Campanula trachelium*, foi evidenciado que essas abelhas são providas de adaptações neurológicas visuais e olfativas que controlam a atração e a preferência inata pelos sinais florais dessa planta hospedeira. As flores de *Ca. trachelium* são caracterizadas por sinais visuais repetitivos na natureza, i.e. cor UV-azul, mas ao mesmo tempo por sinais olfativos específicos, as espiroacetais. Espiroacetais são voláteis florais extremamente raros - das cinco aqui identificadas apenas uma já tinha sido descrita como volátil floral - e são justamente elas as únicas substâncias capazes de atrair abelhas inexperientes de *Ch. rapunculi*. As espiroacetais são, portanto, a chave para o reconhecimento da planta hospedeira *Ca. trachelium* e essa preferência neurológica inata por voláteis florais tão específicos deve ser um dos fatores que explicam a oligoetia em *Ch. rapunculi*. Este estudo mostrou, pela primeira vez, como uma abelha oligolética reconhece sua planta hospedeira.

Na interação entre *Ceblurgus longipalpis* e *Cordia leucocephala*, foram evidenciadas adaptações morfológicas em ambos os parceiros. A abelha *Ce. Longipalpis* desenvolveu peças bucais alongadas e pilosas, incomuns entre abelhas de línguas curtas, para explorar o pólen escondido de flores longistilas de *Co. leucocephala* e o néctar na base do tubo floral, ambos inacessíveis para outros visitantes florais. Nessa interação a planta distílica depende da abelha como único polinizador e a abelha depende da planta como fonte de pólen, representando um dos raros casos de monoetia e de dependência mútua entre abelhas oligoléticas e plantas hospedeiras.

Este estudo abre caminho para trabalhos futuros. Como *Ch. rapunculi* coleta pólen em várias espécies de *Campanula*, é razoável acreditar que os compostos florais específicos de *Ca. trachelium* sejam compartilhados por espécies co-genéricas. Além do mais, espécies de *Campanula* são fontes exclusivas de pólen para diversas espécies de abelhas oligoléticas de diferentes famílias. A avaliação do reconhecimento inato de flores de *Campanula* por diferentes espécies oligoléticas pode revelar uma convergência evolutiva neurológica para o reconhecimento das plantas hospedeiras. Por fim, seria interessante investigar se a abelha monolética *Ce. longipalpis* utiliza voláteis florais espécie-específicos para reconhecer sua única planta hospedeira, *Co. leucocephala*.