



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS DIADEMA
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas



BRUNA CAMPOS BARBOSA

**A EFICIÊNCIA NA POLINIZAÇÃO EM UMA ESPÉCIE DE
LEGUMINOSA COM FLORES DE PÓLEN DEPENDE DO
AJUSTE MORFOLÓGICO COM ABELHAS MAMANGAVAS?**

DIADEMA

2022

BRUNA CAMPOS BARBOSA

**A EFICIÊNCIA NA POLINIZAÇÃO EM UMA ESPÉCIE DE
LEGUMINOSA COM FLORES DE PÓLEN DEPENDE DO
AJUSTE MORFOLÓGICO COM ABELHAS MAMANGAVAS?**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como exigência parcial para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas, ao Instituto
de Ciências Ambientais, Químicas e
Farmacêuticas da Universidade Federal de São
Paulo – Campus Diadema.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Nogueira

Coorientadora: Me. Tamiris Daiane Delgado de
Lima

DIADEMA

2022

Dados Internacionais da Catalogação na Publicação (CIP)

Barbosa, Bruna Campos

A eficiência na polinização em uma espécie de leguminosa com flores de pólen depende do ajuste morfológico com abelhas mamangavas? / Bruna Campos Barbosa. -- Diadema, 2022.
56 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2022.

Orientador: Anselmo Nogueira

Coorientadora: Tamiris Daiane Delgado de Lima

1. Flores de pólen. 2. Variação corporal intraespecífica. 3. Comportamento. 4. Polinização por vibração. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Campus Diadema da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

BRUNA CAMPOS BARBOSA

**A EFICIÊNCIA NA POLINIZAÇÃO EM UMA ESPÉCIE DE
LEGUMINOSA COM FLORES DE PÓLEN DEPENDE DO
AJUSTE MORFOLÓGICO COM ABELHAS MAMANGAVAS?**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como exigência parcial para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas, ao Instituto
de Ciências Ambientais, Químicas e
Farmacêuticas da Universidade Federal de São
Paulo – Campus Diadema.

Data de aprovação:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anselmo Nogueira
Universidade Federal do ABC

Profa. Dra. Laura Carolina Leal de Sousa
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Vinicius Lourenço Garcia de Brito
Universidade Federal de Uberlândia

À minha sobrinha Valentina. Desejo que o mundo seja bem melhor no seu futuro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Vanderlei e Nilsa, por serem exemplos de determinação e força para mim. Sou grata às minhas irmãs, Débora e Danielle, por me apoiarem e principalmente, por me incentivarem em todas as minhas decisões. Agradeço também, ao meu namorado Lucas por permanecer ao meu lado em todo esse tempo e me preencher de carinho. O meu amor está com vocês.

Sou grata aos meus amigos e irmãos de alma que a vida e a UNIFESP me presentearam. Sem vocês, com certeza essa jornada seria mais complicada. Em especial, agradeço ao meu amigo e companheiro de Iniciação Científica Guilherme, o qual me acompanhou dia a dia na realização desse trabalho e foi essencial para que esse projeto saísse do papel.

Aos meus orientadores Anselmo e Tamiris, agradeço imensamente o apoio, ensino e respeito em toda a nossa jornada. Professor Anselmo, obrigada pela parceria e principalmente por acreditar no meu potencial. Espero que o seu brilho e amor pela ciência nunca se acabem! À minha co-orientadora Tamiris, agradeço por ter sido uma pessoa essencial nesse processo, não só pela sua ajuda diária, mas pela amizade que construímos com muito respeito.

Por fim, agradeço a todos meus amigos e colegas do Laboratório de Interação Planta-Animal (LIPA – UFABC) por todos os momentos de descontração e muito conhecimento compartilhado. Principalmente, agradeço à Amanda pela sua grande ajuda e apoio nesses últimos momentos.

Sugestão de mudança de título: Papel da variação do tamanho corporal e comportamento de *Bombus morio* na polinização de uma espécie de leguminosa com flores de pólen

RESUMO

As abelhas de espécies de *Bombus* variam em até 10 vezes seu tamanho corporal, diferenciando-as na divisão de trabalho e na eficiência da polinização. Apesar de ser um aspecto menos explorado, a variação intraespecífica do tamanho dessas abelhas, somado ao seu comportamento, podem ser cruciais para a polinização das espécies vegetais. Este trabalho investigou a interação entre abelhas mamangavas da espécie *Bombus morio* e as flores de pólen da espécie *Chamaecrista latistipula* (Fabaceae), explorando o papel da variação intraespecífica do tamanho corporal e do comportamento dessas abelhas nas flores durante a polinização por vibração. Nós esperamos que abelhas maiores permaneçam por menos tempo nas flores, realizem vibrações com maiores picos de amplitude e desloquem-se menos dentro da flor comparadas com abelhas menores. Adicionalmente, nós esperamos que as abelhas maiores sejam mais eficientes na retirada dos grãos de pólen das anteras e na deposição no estigma, gerando frutos com mais sementes viáveis ao comparar-se com as abelhas menores. Para avaliar essas predições, nós realizamos observações focais das visitas das abelhas em flores virgens. Neste caso, a cada visita, nós quantificamos o tamanho corporal e o comportamento detalhado das abelhas na flor, incluindo o seu deslocamento e as características da vibração realizando filmagens e gravações sonoras. Como resultado, abelhas maiores despenderam menos tempo nas visitas, aplicando menos pulsos de vibrações, e se deslocando menos, ao comparar-se com as abelhas menores. Além disso, essas abelhas maiores aplicaram vibrações com amplitudes de pico relativa maiores. Entretanto, todas as visitantes, independente de seu tamanho e comportamento, foram muito eficientes na retirada dos grãos de pólen das anteras e na deposição no estigma das flores. Nesse sistema planta-polinizador, o comportamento das abelhas menores dentro da flor compensa o seu tamanho corporal reduzido, aumentando a eficiência da polinização pela maior movimentação e tempo despendido a cada visita floral.

Palavras-chave: flores de pólen, variação corporal intraespecífica, comportamento, polinização por vibração.

Nota: Este Trabalho de Conclusão de Curso será submetido como proposta para compor o volume especial "Pollen as the link between phenotype and fitness" na revista científica American Journal of Botany.

ABSTRACT

Bumblebees vary by up to 10 times their body size, differentiating them in the division of labor in the colony with consequences for their foraging pattern. Despite being a less explored aspect, the intraspecific variation of body size of these bees, added to their behavior, can be crucial for plant pollination. This work investigated the interaction between bumblebees of the species *Bombus morio* and the pollen flowers of the species *Chamaecrista latistipula* (Fabaceae), exploring the role of intraspecific variation in bee body size and behavior during buzz pollination in those flowers. We expect larger bees to spend less time on flowers, vibrate with higher peak amplitudes and move less within the flower than smaller bees. Additionally, we expect that larger bees are more efficient in removing pollen grains from poricidal anthers and stigma deposition, generating fruits with more viable seeds when compared to smaller bees. We performed focal observations of bee visits to virgin flowers to evaluate these predictions. In this case, at each visit, we quantified the body size and the complex behavior of these bumblebees on the flower, including their displacement and vibrational features, performing filming and sound recordings. As a result, larger bees spent less time on visits, applied fewer pulses of vibration, and displaced less than smaller bees. In addition, these larger bees applied vibrations with larger relative peak amplitudes. However, regardless of their size and behavior, all bees were very efficient in removing pollen grains from anthers and depositing them on the stigma. In this plant-pollinator system, the more intense behavior of smaller bees inside the flower conditioned by their reduced body size increases pollination efficiency, generating a similar pattern of a positive outcome for plants, independent of the bumblebee size and behavior.

SUMÁRIO

Introdução	9
Materiais e métodos.....	12
Espécies focais e área de estudo	12
Delineamento amostral: tamanho e comportamento das abelhas durante as visitas nas flores	14
Grãos de pólen removidos e eficiência da polinização pela abelha <i>Bombus morio</i>	16
Análises estatísticas	17
Resultados	19
Discussão	21
Considerações finais	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
TABELAS	34
FIGURAS	36
APÊNDICES	40
Apêndice S1	40
Apêndice S2	40
Apêndice S3	42
Apêndice S4.....	43
Apêndice S5	43
Apêndice S6.....	49
Apêndice S7	49
Apêndice S8.....	50
Apêndice S9	50
Apêndice S10	51
Apêndice S11	53
Apêndice S12	53
Apêndice S13.....	54
Apêndice S14.....	54
Apêndice S15.....	54

Introdução

Por volta de 80% das angiospermas dependem do mutualismo com animais para sua reprodução sexuada e persistência das populações (Buchmann, 1983; Sakai, 2001; Switzer *et al.*, 2016; Switzer *et al.*, 2016). Dentre os polinizadores, as abelhas se destacam pela sua preponderância na promoção do serviço de polinização em sistemas naturais e cultivados (Michener, 2007; Rech *et al.*, 2014). A eficiência da polinização das abelhas parece ser primariamente determinada pela variação do seu tamanho corporal associada às diferenças nos seus comportamentos dentro da flor (Zych *et al.*, 2013). Espera-se que a eficiência relativa do polinizador decaia com a diminuição de seu tamanho corporal (Armbruster *et al.*, 1989). Isso se dá porque abelhas menores podem não tocar o estigma de flores relativamente maiores enquanto exploram o recurso floral, seja o pólen (e.g. Solís-Montero *et al.*, 2015) ou o néctar (e.g. Quinalha *et al.* 2017). Já as abelhas de médio e grande porte tocam mais facilmente o estigma, uma vez que seu tamanho excede a separação espacial entre os órgãos sexuais da flor (Solís-Montero *et al.*, 2015, Quinalha *et al.* 2017). Em flores de néctar tubulares, um experimento de exclusão de abelhas maiores (e.g. *Bombus morio*) evidenciou que as espécies menores não tocam as estruturas reprodutivas da flor, não desencadeando a formação de frutos (Quinalha *et al.* 2017). Algo semelhante foi mostrado em um sistema de polinização por vibração. Neste caso, abelhas da espécie *Bombus terrestris* com largura abdominal igual ou maior que a separação entre as anteras e o estigma depositaram uma maior quantidade de grãos de pólen no estigma do que abelhas com largura abdominal menor (Solís-Montero e Vallejo-Marín, 2017). Nestes casos, o ajuste morfológico entre polinizadores e flores condiciona quais visitantes florais polinizam cada espécie de planta (Armbruster e Muchhala, 2009), determinando o limite de distinção entre polinizadores e antagonistas (Solís-Montero *et al.*, 2015).

No entanto, o tamanho corporal também pode estar correlacionado com o comportamento das espécies de abelha dentro da flor, modificando as expectativas baseadas somente no ajuste morfológico entre o visitante e a flor. Por exemplo, espécies de abelhas maiores despendem menos tempo em cada visita floral (“*handling time*”) quando comparadas com espécies de abelhas menores (e.g. Vivarelli *et al.*, 2011 e Quinalha *et al.*, 2017). O tempo que a abelha manipula a flor pode ser dividido no período em que ela explora o recurso floral, período de limpeza e transferência de grãos de pólen para sua escopa ou corbícula (“*grooming time*”; Lichtenberg *et al.*, 2018), quando esse for o caso. Entretanto, ainda não está claro se esse comportamento está relacionado com a variação do tamanho corporal das visitantes,

fazendo-se necessária a sua investigação (Russell *et al.*, 2021). Ademais, espécies de abelhas menores produzem pulsos de vibração de maior duração ao comparar-se com abelhas de tamanhos corporais maiores, as quais vibram por menos tempo (De Luca *et al.*, 2014). Além disso, abelhas de tamanhos corporais menores tendem a se deslocarem mais ao redor das peças florais ao comparar-se com abelhas maiores, as quais visitam as flores mais brevemente (Vivarelli *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2018; Mesquita-Neto *et al.*, 2021). Adicionalmente, indivíduos maiores têm uma janela superior de tempo de forrageamento, pois possuem um conjunto ocular maior que permite visitação às flores nos horários de maior escassez de luz, como os primeiros horários da manhã e ao anoitecer (Kapustjanskij *et al.*, 2007). Todos esses aspectos do comportamento das abelhas criam um gradiente na eficiência da polinização dentro e entre as espécies de abelhas, explicado em grande parte, pelo seu tamanho corporal.

Em plantas com flores de pólen, somente o pólen é o recurso floral mediador da interação planta-polinizador, dominada majoritariamente por espécies de abelhas. Nessas plantas, surgiram mudanças estruturais na flor que limitam a saída dos grãos de pólen durante as visitas das abelhas (Harder e Thomson, 1989; Buchmann, 1985). Nas mais de 20.000 espécies de plantas com flores de pólen (Vogel 1978), os grãos de pólen estão encerrados em anteras poricidas e só são liberados quando determinadas espécies de abelhas vibram as flores (Buchmann, 1983; De Lucca *et al.*, 2019). As abelhas fêmeas dessas espécies agarram-se a uma ou mais anteras e vibram a musculatura de seu tórax, transferindo essa vibração para a flor que libera os grãos de pólen (Michener, 2007; Mesquita-Neto *et al.*, 2018). Parte dos grãos de pólen liberados é levada como alimento para as larvas dessas abelhas (De Luca *et al.*, 2013). Durante esse processo, ocasionalmente as abelhas transferem o pólen para o estigma, caracterizando a polinização por vibração (Rech *et al.*, 2014; Vallejo-Marín, 2019). Nesse sistema, tanto a variação interespecífica quanto intraespecífica no tamanho corporal das abelhas é determinante para o sucesso da polinização (Solís-Montero *et al.*, 2015; Mesquita-Neto *et al.*, 2021), embora o impacto da variação intraespecífica do tamanho corporal sobre a polinização tenha sido muito menos explorado na literatura (Jauker *et al.*, 2016).

Abelhas do gênero *Bombus* variam de forma surpreendente o seu tamanho corporal, em alguns casos, em até dez vezes entre as operárias de suas colônias (Goulson *et al.*, 2002; Austin e Dunlap, 2019). Essa variação intraespecífica ampla do tamanho corporal dessas abelhas tem grande importância na divisão de trabalho estabelecida em cada colônia. Abelhas menores realizam mais frequentemente tarefas dentro da colônia, enquanto as operárias maiores realizam mais comumente o forrageamento (Chole *et al.*, 2019; Goulson *et al.*, 2002). Nesse sistema de divisão de trabalho, abelhas maiores são mais eficientes na coleta de

recursos (Goulson *et al.*, 2002), como a coleta de grãos de pólen (Willmer e Finlayson, 2014). No entanto, mesmo dentro de uma mesma colônia de *Bombus*, existe uma ampla variação do tamanho corporal das abelhas que forrageiam recursos (Garófalo, 1978). Do ponto de vista das plantas, abelhas maiores têm maior chance de polinizar as flores (como explicado acima), e são capazes de carregar maiores cargas polínicas nas regiões corpóreas em que não realizam a limpeza, o que também aumenta a chance da polinização nas próximas flores a serem visitadas (Willmer e Finlayson, 2014; Goulson *et al.*, 2002). Sendo assim, abelhas maiores do gênero *Bombus* podem coletar uma quantidade maior de pólen durante seu forrageamento, o que por outro lado pode favorecer a recepção e transferência desse pólen para o estigma das flores. O sucesso dessa transferência do pólen é regulado pelo acoplamento do corpo da abelha com a distância relativa dos órgãos masculinos e femininos na flor, além do comportamento da abelha dentro da flor (Willmer e Finlayson, 2014; Barret, 2002; Solís-Montero e Vallejo-Marin, 2017).

Na polinização por vibração, o tamanho corporal das abelhas também determina características das vibrações aplicadas pelas abelhas quando essas contraem sua musculatura torácica sobre as anteras poricidas para a liberação dos grãos de pólen (Vallejo-Marín, 2019). Três componentes descrevem as vibrações das abelhas e são variáveis dentro e entre espécies de abelhas: a frequência, a amplitude e o tempo de duração das vibrações (Cocroft *et al.*, 2006; Sueur, 2018). Hoje sabemos que as variações conhecidas das frequências naturais das abelhas têm um efeito reduzido sobre a retirada de pólen, diferentemente da amplitude e do tempo da vibração (número de pulsos ou “*buzzes*” e o tempo pulsando ou “*buzzing time*”, chamado também de duração da vibração; De Luca *et al.*, 2013). Portanto, abelhas que vibram as flores por mais tempo (ou mais pulsos) retiram uma maior quantidade de grãos de pólen da flor (De Luca *et al.*, 2013). Já vibrações de abelhas maiores com picos de amplitude maiores durante as suas visitas também aumentam a retirada do pólen das anteras poricidas (e.g. De Luca *et al.*, 2013). Espécies de abelhas que retiram uma maior quantidade de pólen das flores por visita podem, dependendo do destino do pólen, aumentar a limitação polínica na população (Switzer *et al.*, 2016). Portanto, é de se esperar que abelhas maiores também sejam capazes de ocasionar um custo relativo maior para as plantas do que as abelhas menores, embora esse custo possa ser superado se os benefícios do serviço da polinização forem maiores na população (Zych *et al.*, 2013).

Dessa maneira, neste estudo investigamos como a variação intraespecífica do tamanho corporal das operárias das abelhas *Bombus morio*, tradicionalmente chamadas de mamangavas, se relaciona com o seu comportamento de vibração durante a exploração dos

grãos de pólen de uma espécie de leguminosa com flores de pólen. Conjuntamente, investigamos também se tais variações de tamanho corporal e comportamento nas flores determinam a eficiência do processo de polinização das plantas. Utilizaremos a espécie de leguminosa *Chamaecrista latistipula* (Benth.) Afr. Fern. & E. Nunes (Rando *et al*, 2020), em que mais de 60 % de suas visitas são realizadas por abelhas mamangavas (Lima, 2019). Mais especificamente, este estudo irá responder três questões: (i) qual a relação entre o tamanho corporal das abelhas mamangavas e seu comportamento durante a visita nas flores? (ii) o tamanho corporal e o comportamento das abelhas determinam a remoção de grãos de pólen das anteras? E finalmente, (iii) o tamanho corporal e o comportamento das abelhas determinam a eficiência da polinização? Nós esperamos que abelhas *B. morio* de tamanhos corporais maiores fiquem menos tempo nas flores, e consequentemente vibrem por menos tempo as anteras porcidas e se desloquem menos dentro das flores durante a visita quando comparadas com abelhas menores. Adicionalmente, nós esperamos que a vibração das abelhas maiores tenha um pico de amplitude relativa e pico de frequência maiores. Finalmente, nós esperamos que as abelhas maiores retirem mais grãos de pólen das anteras porcidas, e sejam mais eficientes na deposição dos grãos de pólen no estigma das flores, gerando frutos com um número maior de sementes viáveis ao comparar-se com as abelhas menores. Para responder a essas perguntas, realizamos observações focais das visitas das abelhas em flores virgens. Neste caso, a cada visita das mamangavas nas flores de *C. latistipula*, nós quantificamos o tamanho corporal e o comportamento detalhado das abelhas na flor, incluindo o deslocamento das abelhas durante as visitas e as características da vibração realizando filmagens e gravações sonoras das abelhas nas flores. A partir disso, determinamos o papel das abelhas de diferentes tamanhos na retirada dos grãos de pólen das anteras porcidas e a eficiência das abelhas na transferência de grãos de pólen para o estigma, e posterior formação de frutos e sementes.

Materiais e Métodos

Espécies focais e área de estudo

Para respondermos nossas perguntas e testarmos nossas hipóteses, escolhemos uma espécie de planta leguminosa do gênero *Chamaecrista* e uma espécie de abelha do gênero *Bombus*, ambas amplamente distribuídas no território brasileiro (Souza e Bortoluzzi, 2015a; Françoso, 2015). O gênero *Chamaecrista* Moench corresponde ao segundo gênero mais rico em espécies da família Fabaceae no Brasil, constituída por 330 espécies (Lewis, 2005).

Destas, 207 espécies são endêmicas do Brasil, sendo o país considerado o centro de diversificação do gênero (Souza e Bortoluzzi, 2015b). A espécie focal do nosso estudo, *Chamaecrista latistipula* (figuras 1A e 1B), a qual anteriormente era classificada como *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* (Rando *et al.*, 2020), é um arbusto endêmico do Brasil, o qual é amplamente distribuído do norte à região sul do país (Irwin e Barneby, 1982). Suas flores em antese possuem diâmetro de 2 cm, com cinco sépalas e cinco pétalas, sendo uma delas mais curvada e de maior tamanho, chamada de cuculus (Nogueira *et al.* 2018; Lima, 2019). Ademais, as plantas dessa espécie são caracterizadas por possuírem flores de pólen com conjunto de 10 estames férteis com anteras poricidas (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 1988) e um gineceu unicarpelar responsável por envolver os óvulos. A espécie é autocompatível e autocórica, dispersando as sementes por um mecanismo de explosão dos frutos deiscentes quando maduros e secos (Faegri e van der Pijl, 1979). Em populações naturais, as plantas de *Chamaecrista latistipula* produzem flores por quase todo ano, podendo haver um pico de floração entre janeiro e março (Mesquita-Neto *et al.*, 2018; Valadão-Mendes, 2018) e esse padrão é observado na população distribuída no campus da Universidade Federal do ABC.

O gênero *Bombus* da família Apidae possui aproximadamente 250 espécies de abelhas de tamanhos medianos distribuídas por todo o mundo (Michener, 2007). No Brasil ocorrem seis espécies do gênero, sendo a espécie *Bombus morio* (figuras 1C e 1D) nossa espécie focal (Françoso, 2015). Essa espécie de abelha ocorre desde o noroeste da América do Sul até o sudeste do Brasil, Uruguai e norte da Argentina (Benavides, 2008) e comumente visita flores de espécies de *Chamaecrista*, as quais ocorrem em abundância no domínio do Cerrado (Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 2006; Mesquita-Neto, 2018). Essa espécie de abelha é caracterizada por possuir coloração preta, corpo piloso e tamanho corporal que varia entre 9 a 22 mm de comprimento (Françoso, 2015; Michener, 2007). As fêmeas dessa espécie são forrageadores comuns de flores de pólen, uma vez que são capazes de retirar o pólen contido nas anteras poricidas por vibrarem as flores (Buchmann, 1983). Normalmente, a abelha envolve seu corpo em torno das anteras, segurando-as com suas mandíbulas, e vibra seus músculos torácicos de vôo, liberando os grãos de pólen (Morgan *et al.*, 2016). Entretanto, em observações preliminares realizadas em nossa área de estudo, o comportamento das abelhas *Bombus morio* é distinto nas flores, as quais não seguram as anteras com suas mandíbulas. Ao invés disso, as abelhas utilizam suas pernas e cerdas para se agarrar a estrutura floral, especialmente nas pétalas, e durante a contração da musculatura torácica realizam batidas com suas cabeças na base das anteras, transferindo a vibração para a flor (observações pessoais de

Anselmo Nogueira). Em um uma população de *Chamaecrista latistipula*, a espécie *Bombus morio* foi responsável por 51% das visitas, realizando em média cerca de 10 visitas por hora em cada flor disponível nas plantas amostradas, sendo o visitante floral mais frequente nessa população de *C. latistipula* (Nogueira *et al*, 2018). Já na nossa população esse valor já chegou a mais de 80 % das visitas.

O estudo foi conduzido dentro do campus da Universidade Federal do ABC (UFABC) no município de São Bernardo do Campo/SP, em uma área de 2500 m² que conta com 30 indivíduos de *Chamaecrista latistipula* transplantados de uma população de plantas na margem da Represa Cantareira no município de Franco da Rocha em dezembro de 2018 (Apêndice S1). Os indivíduos de *C. latistipula* foram transplantados para vasos de 18 litros no pico da estação chuvosa para evitar a mortalidade das plantas pós-transplantes. Os transplantes conservaram grande parte do solo original adjacente ao sistema radicular das plantas, mas adicionamos um substrato de 60% de areia lavada fina com 40% de terra vegetal para completar o solo dos vasos.

Delineamento amostral: tamanho e comportamento das abelhas durante as visitas nas flores

Para investigar a relação entre o tamanho corpóreo e o comportamento das abelhas *Bombus morio*, e seu papel na retirada dos grãos de pólen das anteras e na eficiência da polinização em flores de *C. latistipula*, realizamos observações das visitas das abelhas em flores virgens. Nós selecionamos de 5 a 10 botões florais em estágio de pré-antese nos 30 indivíduos de *C. latistipula* ao longo dos dias de amostragem. Os botões em pré-antese foram previamente ensacados em sacos de tule pequenos a fim de impedir que abelhas e outros insetos visitassem as flores no início de sua abertura. No início da antese floral a partir das 6 horas da manhã, os sacos de tule foram retirados um de cada vez, e foi permitida a visita de uma única abelha da espécie *Bombus morio*. Após a visitação, a flor foi ensacada novamente a fim de se evitar novas visitas nas flores. Caso a primeira visita da flor não tenha sido da espécie *B. morio*, essa flor foi desconsiderada em nossa amostragem. O trabalho de campo foi iniciado no dia 25 de janeiro de 2021 e finalizado no dia 04 de março de 2021, em dias de amostragem não consecutivos ao longo desse período. Ao todo foram registradas 59 observações de abelhas da espécie *Bombus morio* nas flores de *Chamaecrista latistipula*.

Cada uma das visitas das abelhas foi filmada e o som que elas emitiram nas flores foi gravado de forma independente. As filmagens foram feitas por uma câmera fotográfica modelo Canon T5i lente 18-55, a qual foi colocada em tripé direcionado para a flor a uma

distância de 20 cm. Antes das filmagens, adicionamos ao lado de cada flor uma escala posicionada a uma distância e posição padronizada da câmera fotográfica. A partir das gravações em vídeo, capturamos imagens das abelhas nas flores e estimamos a largura torácica (em média $8.91 \text{ mm} \pm 2.02$), abdominal (em média $9.72 \text{ mm} \pm 2.29$) e distância intertegular (i.e. distância entre a base das asas da abelha; em média $6.14 \text{ mm} \pm 1.66$) utilizando o programa ImageJ 1.8.0. Nós exploramos o comportamento das abelhas analisando também seu deslocamento dentro das flores. Para isso, nós quantificamos o deslocamento angular das abelhas *Bombus morio* devido ao fato delas se deslocarem ao redor das anteras após cada pulso de vibração, em um comportamento circular ao redor das anteras centrais nas flores. Dessa forma, o deslocamento angular foi uma estratégia adequada para descrever esse comportamento nas flores de *C. latistipula*. No entanto, como as abelhas se deslocam tanto no sentido horário como anti-horário dentro de uma mesma visita, nós derivamos o deslocamento angular para outras variáveis que pudessem incorporar essa complexidade do comportamento das abelhas. Assim, extraímos três variáveis de deslocamento das abelhas dentro da flor: o deslocamento angular máximo, o deslocamento angular somado e o deslocamento angular médio, todos em graus. O deslocamento angular máximo refere-se à posição mais distante da abelha ao comparar-se com as demais localizações durante as suas vibrações na flor. Já o deslocamento angular somado trata-se do somatório dos deslocamentos da abelha por vibração. O deslocamento angular médio consiste na divisão do deslocamento angular somado pelo número de pulsos de vibração (“buzzes”) subtraído por um, visto que a sua primeira vibração foi considerada como posição zero na flor (Apêndice S2). Além disso, nós também obtivemos outros descritores do comportamento das abelhas nas flores, tais como o número de pulsos de vibração, o tempo total da abelha na flor após seu pouso (em segundos), conhecido como tempo de manipulação (“handling time”), além do tempo vibrando as anteras (“buzzing time”) e o tempo de limpeza das abelhas (“grooming time”). Para os detalhes desses descritores de comportamento ver o Apêndice S3.

As gravações de áudio das visitas foram realizadas com o microfone unidirecional Yoga HT-81 acoplado a um gravador Sony ICD-PX240, sempre a uma distância de 15 cm das flores, ao lado da câmera para filmagem. Utilizamos o pacote de software Audacity 2.3.2., analisamos os sons obtidos pelo gravador durante cada visita das abelhas nas flores focais. Inicialmente nas análises de som, padronizamos o espectrograma para tamanho 8192, tipo “Hamming” e frequência máxima de 3.000 Hz com escala cinza, filtro passa-alto com um roll-off de 12 dB por oitava e uma frequência de corte de 100 Hz para a redução de ruídos. A partir do som das abelhas nas flores, quantificamos duas variáveis que descreveram as

vibrações das abelhas nas flores: o pico de frequência (em Hz) e o pico de amplitude relativa (dB). No entanto, como em cada visita uma mesma abelha emitiu vários pulsos de vibração, nós extraímos o pico de frequência e o pico de amplitude relativa para cada um dos pulsos, e depois calculamos a média entre os pulsos para ter um único valor de frequência e amplitude por visita de abelha na flor. Portanto, daqui para frente chamaremos de pico de frequência, e pico de amplitude relativa, as médias entre pulsos de vibração para cada visita floral. A duração (em segundos) foi decomposta utilizando-se os vídeos das visitas em tempo de manipulação, tempo de vibração e tempo de limpeza, descritos acima.

Nós também aplicamos o índice de acoplamento morfológico proposto por Solís-Montero & Vallejo-Marín (2017). Para isso, medimos com um paquímetro a hercogamia de cada flor, ou seja, a distância entre o estigma e o poro da antera mais próxima do gineceu (separação espacial dos órgãos sexuais dentro da flor; Barret, 2002). O índice de acoplamento é a diferença entre a medida de hercogamia da flor e a largura do abdômen da abelha (Solís-Montero & Vallejo-Marín, 2017). Quando a diferença entre a hercogamia da flor e a largura do abdômen da abelha for igual a zero, o abdômen da abelha encaixa-se exatamente no espaço entre o estigma e as anteras. Caso o índice de acoplamento seja positivo, significa que a hercogamia da flor é maior do que o abdômen da abelha, portanto, a abelha não é capaz de tocar os órgãos sexuais simultaneamente. Caso o índice de acoplamento seja negativo, a hercogamia da flor é menor que a largura do abdômen da abelha e, portanto, a abelha é capaz de tocar os órgãos sexuais simultaneamente. Neste estudo, em todos os casos as abelhas tocaram simultaneamente o poro da antera mais próxima e o estigma das flores (valores negativos do índice de acoplamento), e em somente uma exceção o índice foi positivo (Apêndice S4).

Grãos de pólen removidos e eficiência da polinização pela abelha *Bombus morio*

Para avaliar a eficiência das abelhas em retirarem os grãos de pólen das anteras poricidas de acordo com o seu tamanho e comportamento, quantificamos o restante de pólen que ficou nas anteras após as visitas de cada abelha. Para isso, o androceu das flores visitadas foi removido com cuidado e fixado em FAA 50% por 24 horas. O androceu foi colocado em um eppendorf de 2 ml e adicionamos 600 µl de água destilada com Tween²⁰. Em seguida, adicionamos uma microesfera de 0,90 g e agitamos o eppendorf com um agitador vortex da marca Biomixer modelo VTX-2500 em velocidade máxima por 180 segundos. Mantivemos o eppendorf no agitador para manter os grãos de pólen em suspensão, retiramos uma alíquota de 10 µl da solução com uma micropipeta e colocamos a alíquota na Câmara de Neubauer para a

realização da contagem dos grãos de pólen no microscópio de luz no aumento de 40x. Esse procedimento de extração e contagem de grãos de pólen foi otimizado em flores de *C. latistipula* dado o tamanho das anteras, do poro das anteras e dos grãos de pólen. O detalhamento dos procedimentos realizados na contagem dos grãos de pólen está descrito no Apêndice S5. Para estimar a quantidade total de grãos de pólen das anteras das flores de *C. latistipula*, nós também realizamos a contagem de grãos de pólen em anteras virgens de 11 botões em pré-antese de diferentes plantas de *C. latistipula* seguindo os mesmos procedimentos descritos acima. Por fim, foi possível quantificar o número de grãos de pólen retirados em uma visita única pela diferença entre número de grãos de pólen presentes em uma flor virgem não visitada e o número de grãos de pólen restantes nas anteras após a visita da abelha em cada uma das plantas focais.

Para avaliar a eficiência da polinização, ensacamos e marcamos com uma fita adesiva numerada cada flor visitada pela espécie *B. morio*. A porção distal do estilete foi destacada das flores 24 horas após a visita das abelhas para estimarmos o número de grãos de pólen no estigma. O restante do gineceu permaneceu ligado à planta para o desenvolvimento do fruto em caso de polinização e fertilização dos óvulos. Esse procedimento foi testado em um estudo piloto prévio, e verificamos que a retirada da porção distal do estilete 24 horas após a deposição do pólen no estigma não impede a formação de frutos e sementes, dado que os tubos polínicos são formados e alcançam os óvulos nas primeiras 12 horas depois da polinização. Além disso, a observação dos grãos de pólen no estigma e sua contagem em microscópio não são prejudicados após esse período. A porção distal do estilete retirada das flores foi fixada em solução de FAA 50 % por 24 horas. Em seguida, a amostra foi transferida para uma solução de etanol 70%. Para quantificar os grãos de pólen depositados no estigma, transferimos a amostra para uma lâmina de microscópio e cortamos a parte do estilete mais distante do estigma, descartando esse trecho. Foi adicionada uma gota do corante Carmin Acético e uma lamínula sobre a amostra contendo o estigma, a qual foi pressionada para a acomodação do material entre a lâmina e a lamínula (Apêndice S6A). Após 5 minutos, observamos o material no microscópio de luz no aumento de 40x (Apêndice S6B). De forma complementar, as flores visitadas foram inspecionadas uma vez por semana para a observação da formação de frutos e contagem do número de sementes produzidas por fruto.

Análises estatísticas

Para testar a relação entre o tamanho e o comportamento das abelhas, inicialmente aplicamos uma técnica de ordenação multivariada sobre as variáveis que descreviam o

comportamento das abelhas, dado que quantificamos nove variáveis descrevendo seu comportamento. Como o pressuposto das análises de ordenação é a correlação entre as variáveis, inicialmente aplicamos o teste de esfericidade de Bartlett sobre as variáveis de comportamento das abelhas (i.e. tempo de forrageio, tempo de vibração, tempo de limpeza, número de pulsos, pico de frequência, pico de amplitude relativa, deslocamento angular máximo, somado e médio) para avaliar o grau de correlação entre essas variáveis. Nós verificamos a existência de uma alta covariância entre essas variáveis ($X^2 = 587.06$, $p < 0.01$), adequada para a aplicação das técnicas multivariadas como a PCA. Sendo assim, realizamos a Análise de Componentes Principais (PCA). Para verificar quais Componentes Principais advindos do PCA são biologicamente interpretáveis e quais cargas estão relacionadas com cada componente principal, aplicamos testes de randomização como proposto por Bjorklund (2019), utilizando a função “randomizeMatrix” do pacote “picante” do R (Kembel *et al*, 2010). Uma vez determinado os eixos do PCA relevantes, testamos a relação entre esses eixos descrevendo o comportamento e o tamanho corporal das abelhas utilizando modelos de regressão linear simples. Como nas análises de regressão utilizamos a distribuição probabilística gaussiana (normal), nestes casos, nós testamos os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância dos resíduos por meio da inspeção gráfica de QQ-plots e dos resíduos. Nos casos em que os pressupostos não tenham sido alcançados, aplicamos a transformação de raiz quadrática nas variáveis analisadas.

Para testar o papel do tamanho corporal e o comportamento das abelhas (eixos da PCA) sobre a retirada de grãos de pólen do estigma e da eficiência da polinização, nós construímos um conjunto de oito modelos lineares generalizados (GLM). Como ambos os eixos da PCA (PC1 e PC2) descrevendo o comportamento das abelhas estiveram relacionados com o tamanho das abelhas (ver resultados), nós não colocamos esses eixos e o tamanho das abelhas nos mesmos modelos para testar o seu efeito sobre a retirada de grãos de pólen das anteras e a eficiência da polinização devido ao pressuposto de colinearidade dos testes estatísticos. Portanto, rodamos modelos separados considerando os descritores de comportamento e o tamanho das abelhas. As variáveis respostas utilizadas nesses modelos foram a proporção de grãos de pólen removidos das anteras pelas abelhas (variável do tipo proporção), o número de grãos de pólen no estigma transferidos pelas abelhas (variável do tipo contagem), formação de fruto (variável binária) e a proporção de sementes viáveis nos frutos (variável do tipo proporção). A distribuição probabilística aplicada em cada modelo estatístico foi decorrente da natureza da variável resposta e da existência de sobredispersão nos resíduos. Para a proporção de grãos de pólen removidos das anteras poricidas, nós

utilizamos um GLM associado à distribuição probabilística binomial. Para o número de grãos de pólen no estigma, nós utilizamos um GLM associado à distribuição probabilística binomial negativa devido à sobredispersão dos resíduos quando aplicamos a distribuição de Poisson. Neste caso, aplicamos a função “glm.nb” disponível no pacote MASS (Venables e Ripley, 2002) do programa R. Já para analisar a formação de frutos, nós aplicamos um GLM associado a distribuição probabilística binomial. De forma semelhante, quando analisamos a proporção de sementes viáveis por fruto nós aplicamos um GLM com distribuição probabilística binomial.

Em todos os casos, previamente as análises, nós aplicamos a função “scale” nos fatores para padronizar a estimativa dos coeficientes de inclinação da reta em cada modelo, e poder comparar o tamanho do efeito de cada um deles diretamente, independente da unidade de medida de cada fator. Previamente, nós também testamos se o horário de chegada da abelha na flor ao longo do tempo impactou o comportamento das abelhas nas flores. Em todos os testes, o horário da visita não foi relevante para os fenômenos investigados aqui. Todas as análises estatísticas foram realizadas no Software RStudio (R Core Team, 2021).

Resultados

As abelhas *Bombus morio* visitantes das flores de *Chamaecrista latistipula* realizaram, em média, 14.1 ± 10.8 (média $\pm$ desvio padrão) pulsos de vibrações. Em média, as abelhas manipularam as flores por 37.2 ± 33.8 segundos (“*handling time*”), sendo que em média a abelha vibrou as anteras (“*buzzing time*”) por cerca de 15.1 ± 12.5 segundos (soma dos diferentes pulsos), enquanto que o tempo de limpeza foi de 14.6 ± 16.2 segundos. Em relação ao seu comportamento de vibração, as abelhas em média tiveram picos de frequência de 198.7 ± 30.9 Hz e picos de amplitude relativa de -30.8 ± 5.7 dB. Além disso, em média, seu deslocamento angular máximo foi de 92.2 ± 64.5 graus, e entre cada pulso de vibração, as abelhas se deslocaram na flor em média 25.1 ± 23.8 graus.

As abelhas *B. morio* foram capazes de retirar em média cerca de 883774 ± 18792 grãos de pólen das flores de *C. latistipula* que correspondeu a cerca de $98 \% \pm 0.02$ do total contido nas anteras porcidas. Em média, 39.8 ± 24.5 grãos de pólen foram depositados nos estigmas das flores visitadas, e $88 \% \pm 0.3$ das visitas nas flores de *C. latistipula* resultaram na formação de frutos. Dos frutos formados, em média cada fruto teve 11.0 ± 6.4 sementes viáveis, correspondendo a cerca de 59% do total de óvulos contidos nos frutos. A variação na quantidade de pólen nos estigmas não influenciou na posterior formação de frutos ou no

número de sementes viáveis formadas nos frutos (Apêndice S7).

Qual a relação entre o tamanho corporal das abelhas e seu comportamento durante a visita nas flores?

Primeiramente, para descrever o comportamento das abelhas, nós aplicamos uma análise de componentes principais (PCA) para reduzir a dimensionalidade do comportamento das abelhas, dado que é esperado que parte desses descritores estejam correlacionados entre si. A análise dos componentes principais (PCA; resumo dos resultados no Apêndice S8) das variáveis relacionadas ao comportamento das abelhas indicou que os dois primeiros eixos principais (PC1 e PC2 daqui pra frente) recuperam informações biológicas importantes do comportamento das abelhas (teste de randomização: $p < 0.001$ para os dois primeiros eixos; Apêndice S9), explicando cerca de 54.2% e 20.7% da proporção da variância, respectivamente (Figura 2). Além disso, deu-se que o tempo de manuseio da flor, o tempo de vibração, o tempo de limpeza das abelhas, o número de pulsos de vibração por visita, o deslocamento angular máximo e o deslocamento somado foram as variáveis que contribuíram com cargas altas no PC1 (teste de randomização para cada uma das variáveis: $p < 0.001$; Apêndice S10A). Já o pico de amplitude relativa e o deslocamento angular médio contribuíram com cargas altas no PC2 (teste de randomização para cada uma das variáveis: $p < 0.001$; Apêndice S10B). Somente o pico de frequência não foi importante para compor os dois primeiros eixos principais descrevendo o comportamento das abelhas.

O tamanho corporal das abelhas *Bombus morio* relacionou-se negativamente com o PC1 e o PC2 (Tabela 1; Figura 3). O PC1, o qual representou 6 variáveis de comportamento, teve uma relação mais forte com a largura torácica das abelhas *B. morio* em comparação com os demais descritores de tamanho das abelhas (primeira linha da Tabela 1; Figura 3A). Já o PC2, constituído por 2 variáveis, teve uma relação mais forte com a largura abdominal (quinta linha da Tabela 1; Figura 3D). A distância intertegular foi a única variável de tamanho que não esteve relacionada com os componentes de comportamento das abelhas (Apêndice S11). Considerando as cargas associadas a cada componente principal e as relações detectadas com os descritores de tamanho das abelhas, abelhas maiores manuseiam as flores por menos tempo e tendem a vibrar e limpar-se por menos tempo também, além de realizarem menos pulsos de vibração comparados com abelhas menores. Além disso, abelhas maiores deslocam-se menos ao redor das anteras quando comparadas com abelhas menores, e realizam vibrações com picos de amplitude relativa maiores.

O tamanho corporal e o comportamento de vibração das abelhas estão relacionados com a remoção de grãos de pólen das anteras e a eficiência da polinização?

Em geral, independente do tamanho corporal e do comportamento das abelhas, *Bombus morio* retiraram a maior parte dos grãos de pólen das anteras poricidas e foram muito eficientes na polinização das flores de *C. latistipula*. A largura torácica representando o tamanho das abelhas não esteve relacionada com a proporção de grãos de pólen removidos das anteras poricidas (ou com os três descritores da eficiência da polinização: número de grãos de pólen no estigma, formação de frutos e proporção de sementes viáveis por fruto (Tabela 2; Figura 4). Além disso, os dois primeiros eixos principais (PC1 e PC2) representando o comportamento das abelhas também não se relacionaram com a proporção de grãos de pólen removidos e os descritores da eficiência da polinização (Tabela 2; Apêndice S12 a S15).

Discussão

Neste trabalho, nós relacionamos o tamanho corporal com o comportamento de abelhas *Bombus morio* durante visitas nas flores da leguminosa *Chamaecrista latistipula*, e em seguida, avaliamos o seu impacto sobre a retirada do pólen e processo de polinização nessas flores. Seguindo nossas expectativas, nós encontramos que abelhas maiores de *Bombus morio* (i) realizam visitas mais rápidas ficando menos tempo manipulando as flores, vibrando as anteras poricidas e se limpando após a retirada dos grãos de pólen, (ii) se deslocam menos dentro das flores e também entre os pulsos de vibração das anteras, (iii) e realizam uma vibração com um pico relativo de amplitude maior quando comparada com abelhas menores. De forma contrária as nossas expectativas, as abelhas maiores retiraram quantidade semelhante de grãos de pólen das anteras poricidas, e foram tão eficientes quanto na polinização, que as abelhas menores. Em ambos os casos, as abelhas retiraram em média quase todo o pólen das anteras, e transferiram pólen para o estigma em quantidade suficiente para formar fruto e sementes viáveis na maioria dos casos, independente do tamanho das abelhas. A variação do comportamento das abelhas dentro da flor dependente de seu tamanho corporal, gerou um padrão semelhante de eficiência da polinização nas flores de *C. latistipula* independente do tamanho das abelhas *Bombus morio*. Abaixo nós discutimos os padrões detectados e sua relevância para a biologia reprodutiva das plantas.

Abelhas menores: mais tempo e deslocamento na flor, mas menos força por pulso de

vibração nas anteras

A variação do tamanho das abelhas *B. morio* está intrinsecamente relacionada aos componentes que descrevem o seu comportamento durante as visitas nas flores de *C. latistipula*. As abelhas de tamanhos corporais menores despenderam em média 40 segundos a mais do tempo de manuseio na flor (“*handling time*”) ao comparar-se com as abelhas maiores, o que corrobora estudos anteriores em outros sistemas (Vivarelli *et al.*, 2011; Quinalha *et al.*, 2017). Em um sistema de polinização com flores de *Jacaranda caroba*, espécies de abelhas menores despenderam cerca de 30 segundos a mais de visita ao comparar-se com as espécies de visitantes maiores (Quinalha *et al.*, 2017). Adicionalmente, as abelhas de maior tamanho corporal realizaram pulsos de vibração com menor duração, diferentemente do que se observou nas visitas de abelhas menores. De Luca *et al.* (2014) observou uma relação negativa entre a largura torácica das espécies de abelhas e a duração dos pulsos de vibração (aqui chamada de *buzzing time*), 0.33 segundos a mais em abelhas menores, semelhante ao que observamos em nosso estudo. A relação entre o tempo de limpeza (*grooming time*) e a variação do tamanho corporal das abelhas não é amplamente conhecida (e. g. Russell *et al.*, 2021), entretanto em nosso sistema, confirmamos a existência de uma relação negativa entre essa variável comportamental e o tamanho corporal das abelhas *B. morio*. Abelhas menores despenderam cerca de 20 segundos a mais de limpeza em relação às abelhas maiores. Ainda, abelhas menores deslocam-se mais nas flores e provavelmente esse padrão ocorre porque essas abelhas encontram uma maior dificuldade em vibrar todas as anteras de uma única vez, diferente do que se observa em abelhas maiores, as quais são capazes de abraçar a maior parte do androceu com maior facilidade. De forma semelhante, em outra espécie de *Chamaecrista*, o mesmo padrão (e.g. abelhas de tamanhos maiores agarram todas as anteras e as vibram ao mesmo tempo mantendo-se em posição fixa, enquanto que abelhas menores vibram as anteras em diferentes posições) foi observado entre espécies de abelhas de diferentes tamanhos (Mesquita-Neto *et al.*, 2021). Portanto, o maior tempo de manuseio, juntamente com a maior duração de cada pulso de vibração e até mesmo o maior deslocamento na flor durante a visita podem ser considerados como uma compensação para que essas abelhas menores acessem mais facilmente os recursos da flor (De Luca *et al.*, 2013; Rosi-Denadai *et al.*, 2018).

Além disso, a amplitude da vibração, a qual se refere à intensidade exercida pela abelha ao vibrar seus músculos torácicos (King, 1993), foi maior nas visitas efetuadas por abelhas de maior tamanho, confirmando o que já se observou em estudos anteriores (i.e. De

Luca *et al.*, 2013). Em um sistema entre abelhas *Bombus impatiens* e flores do gênero *Solanum*, observou-se uma relação positiva entre a massa corporal das visitantes florais com a amplitude de pico relativa, em que abelhas maiores tiveram em média uma amplitude 0.25 vezes maior que as menores abelhas do estudo (De Luca *et al.*, 2018). As abelhas de tamanhos corporais maiores, por efetuarem vibrações com amplitudes de pico relativas mais altas, retiram uma quantidade maior de grãos de pólen por visita, já que há uma relação positiva entre a extração de pólen e o pico de amplitude (De Luca *et al.*, 2013; De Luca *et al.* 2014). Portanto, abelhas maiores aplicam menos pulsos de vibração a cada visita, o que explica também o menor tempo total de vibração despendido a cada visita por essas abelhas. Além disso, descrevemos que as abelhas menores limpam-se por mais tempo durante a visita (comportamentos de limpeza não consecutivos), o que pode estar relacionado com o maior número de pulsos de vibração ao longo da visita (e maior tempo total vibrando) nas flores de *C. latistipula*. Neste caso, as abelhas criariam uma quantidade maior de momentos de limpeza, pois estariam se deslocando mais na flor ao aplicar mais pulsos de vibração, cada vez em um conjunto de anteras diferente, não completamente exploradas durante a visita. Tanto abelhas de tamanhos corporais maiores, quanto abelhas de menor tamanho podem atingir frequências semelhantes durante uma visita floral (Vallejo-Marín, 2019), como o detectado em nosso estudo.

Tamanho corporal e comportamento se complementam e as abelhas quase sempre são muito eficientes na retirada do pólen e na polinização

Esperávamos que as abelhas *Bombus morio* de tamanhos maiores retirassem mais grãos de pólen das anteras por visita, enquanto as abelhas de menor tamanho retirassem uma menor quantidade. Ainda, previmos que as abelhas maiores, devido ao seu tamanho corporal e a carga polínica carregada em seu corpo, depositassem uma maior quantidade de grãos de pólen no estigma, produzindo frutos com mais sementes viáveis, diferentemente do que se previa para abelhas menores. As abelhas *B. morio* visitantes das flores de *Chamaecrista latistipula* do nosso sistema, apesar de diferenciarem-se no tamanho corporal, não se distinguiram na extração de grãos de pólen das anteras de *C. latistipula*. Além disso, não verificamos diferença na eficiência na polinização entre os diferentes tamanhos das abelhas *B. morio*. De forma surpreendente, em uma única visita de *Bombus morio*, independente do seu tamanho corporal, praticamente todo o grão de pólen das anteras poricidas foram removidos e a polinização foi realizada de forma exitosa.

Em média, as abelhas *B. morio* depositam em apenas uma única visita cerca de 39.8 grãos de pólen no estigma das flores de *C. latistipula*. Já as flores de *C. latistipula* produzem, em média, 17 óvulos (Lima, 2019) e com essa quantidade de grãos de pólen depositados nas flores, as visitantes *B. morio* podem ser consideradas em sua maioria como muito eficientes. Como explicar essa alta eficiência de abelhas pequenas e grandes de *B. morio* nas flores de *C. latistipula*? Nesse sistema planta-polinizador, o comportamento das abelhas menores dentro da flor para conseguir explorar uma quantidade maior de grãos de pólen compensa o seu tamanho corporal reduzido, aumentando a eficiência da polinização pela maior movimentação e tempo despendido a cada visita floral. Esperava-se que abelhas menores fossem menos eficientes devido ao seu tamanho corporal e a distância relativamente maior dos órgãos sexuais da flor (Willmer e Finlayson, 2014; Solís-Montero e Vallejo-Marín, 2017; Mesquita-Neto *et al.*, 2021), entretanto o seu comportamento com visitas mais longas, maiores deslocamentos na flor e até mesmo um maior número de pulsos de vibração por visita, compensam qualquer limitação que poderia existir devido ao tamanho corporal dessas abelhas.

Porém, devemos considerar fatores adicionais para além do tamanho e comportamento das abelhas impactando a polinização dessas flores, fatores que não foram controlados em nosso estudo. O mais importante deles é a carga polínica pré-existente nos corpos das abelhas *B. morio* antes de visitar as flores de *C. latistipula*, e de forma associada, o número de visitas que essas abelhas efetuaram anteriormente à visita observada. Para tentar controlar esse impacto na transferência do pólen, amostramos as abelhas nas flores uma hora após o início da abertura das flores no campo. Assim, todas as abelhas amostradas já deveriam ter uma carga polínica considerável em seus corpos. Também analisamos se o horário de amostragem de cada abelha (e visita) impactou o número de grãos de pólen transferido para o estigma das flores, mas não detectamos esse efeito do horário. Sendo assim, consideramos que esses fatores devem ser menos importantes para explicar os padrões encontrados neste estudo.

Sabe-se que a retirada dos grãos de pólen contidos nas anteras de flores de pólen pode ser determinada tanto pela amplitude de vibração, quanto pela duração dessas vibrações durante a visita (De Luca *et al.*, 2013; Rosi-Denadai, 2018). Embora a amplitude esteja positivamente correlacionada ao tamanho da abelha visitante, não observamos a associação desse componente de comportamento com a remoção de grãos de pólen das anteras de *C. latistipula* pelas abelhas *B. morio* do nosso sistema. Cerca de 90% dos grãos de pólen foram retirados durante as visitas das abelhas *B. morio*, independente de seu tamanho corporal. Diante disso, as abelhas se mostraram muito eficientes na coleta dos grãos de pólen das

anteras de *C. latistipula* e essa situação pode ser explicada também pela compensação do comportamento em relação aos tamanhos corporais das visitantes. O fato das abelhas menores realizarem mais vibrações em períodos maiores de visita pode compensar a eficiência de ejeção de pólen pelas abelhas maiores, que executam vibrações com valores de amplitudes mais altas. E o que significa uma abelha que retira muito pólen em uma única visita? Na perspectiva da abelha, a coleta dos grãos de pólen das flores é de extrema importância na alimentação rica em proteína de suas larvas (Rech, *et al.*, 2014;). Portanto, uma alta disponibilidade de grãos de pólen no ninho corresponde a uma melhor qualidade na alimentação das futuras forrageadoras de flores. Sabe-se que a diferença de tamanho das abelhas operárias adultas está intimamente relacionada à disponibilidade dos recursos alimentares oferecidos às larvas (Goulson, 2003; Persson e Smith, 2011). Portanto, abelhas maiores são mais eficientes na retirada dos grãos de pólen das flores pois, em menor tempo, retiram quase que completamente seus grãos de pólen, podendo disponibilizar em menor tempo uma quantidade maior de grãos de pólen para as larvas nas colônias. Além disso, coletar em menor tempo também significa entrar em menos conflitos pelo recurso com potenciais competidores e encontrar menos flores vazias de pólen (ou mais flores cheias), e portanto, é bastante provável que abelhas maiores tenham menos custos durante o forrageio das flores comparadas com abelhas menores. No entanto, essa é a perspectiva da abelha, na perspectiva da planta ambas as abelhas maiores e menores de *Bombus morio* geram um saldo positivo na promoção da polinização dessas flores.

Uma das lacunas existentes na literatura é entendimento sobre a relação entre a retirada dos grãos de pólen pelos polinizadores e a eficiência na polinização (Minnaar *et al.*, 2019). Em nosso sistema, as abelhas *B. morio* são capazes de retirar muito pólen das flores de *C. latistipula*, independente de seu tamanho corporal e em apenas uma única visita. Entretanto, não sabemos se essa retirada dos grãos de pólen das anteras resulta em um custo elevado dessa interação para a planta. É possível refletir sobre dois cenários possíveis: uma interação que resulta em uma baixa perda de grãos de pólen para a planta e outro com uma alta perda. No primeiro cenário, espera-se que a abelha retire muito pólen das anteras, e embora parte do pólen se perca da abelha e da flor, uma parte considerável forme a carga polínica nos “locais seguros” do corpo da abelha (Koch *et al.*, 2017; Macior, 1967; Kimsey, 1984; Thorp, 2000), favorecendo a distribuição do gameta masculino dessa flor no entorno da população, principalmente nos casos em que a ocorrência de polinizadores seja limitada (Minnaar *et al.*, 2019). Já no segundo cenário, a abelha retira uma grande quantidade de pólen das anteras da flor, entretanto, grande parte desse pólen é perdido da abelha e da flor, e

secundariamente a abelha é muito eficiente na limpeza da carga polínica em seu corpo, transferindo esse pólen para a corbícula e posteriormente para as colônias. No viés da planta, a eficiência da limpeza pela abelha é prejudicial, visto que os grãos de pólen não sobram para as visitas subsequentes e assim não podem ser depositados no estigma de outra flor co-específica. Não conhecemos o caminho do pólen a partir do trajeto efetuado pelas abelhas *B. morio* após uma primeira visita, mas estudos experimentais futuros poderão investigar quais são as rotas desse grão de pólen após sua retirada em flores de *C. latistipula*, e de fato estimar, o custo dessas interações (em pólen) para a planta.

Considerações finais

Abelhas do gênero *Bombus*, incluindo as abelhas *Bombus morio*, são abelhas coloniais caracterizadas por possuírem tamanhos corporais variáveis dentro de suas colônias (Alford, 1975), e, portanto, tal variação tem um papel importante na divisão de trabalho nas colônias e no serviço de polinização promovido por essas abelhas nativas (Goulson *et al.*, 2002; Willmer e Finlayson, 2015). No entanto, embora a variação corporal dessas abelhas esteja intimamente relacionada a certos componentes de seu comportamento, como descritores de vibração, tempo de manuseio ou até mesmo o deslocamento dentro da flor, a eficiência da polinização foi independente da variação do tamanho corporal. Nossos resultados evidenciaram o aspecto complementar do tamanho corporal e comportamento dessas abelhas, gerando um padrão semelhante de eficiência na retirada dos grãos de pólen das anteras poricidas e da polinização em flores de *C. latistipula*. Além disso, as abelhas *Bombus morio* prestam um serviço essencial de polinização para outras espécies vegetais nativas e cultiváveis, para além das flores de *Chamaecrista latistipula*. Essas abelhas estão distribuídas ao longo de todo território brasileiro, e nos sistemas cultiváveis, são polinizadoras de variedades com grande importância alimentícia e econômica, como tomate (*Solanum lycopersicum*), berinjela (*Solanum melogena*) e pimentões (*Capsicum annuum*) (Freitas *et al.*, 2020). Para além da visão antropológica, o gênero *Bombus* constitui o grupo de eficientes polinizadores (Giannini *et al.*, 2015) responsáveis pela manutenção da biodiversidade em diferentes sistemas tropicais e subtropicais (Daily, 1997), como o sistema investigado neste estudo. No entanto, é possível constatar a queda da abundância desse gênero de abelhas nos sistemas naturais (Winfrey *et al.*, 2009; Bartomeus *et al.*, 2013). Essa queda têm sido associada a diminuição dos recursos alimentares e a perda de habitat para essas abelhas, principalmente pela ação de agrotóxicos e pesticidas, além da introdução de espécies invasoras (Thompson, 2001; Goulson *et al.*, 2008;

Whitehorn *et al.*, 2012). Sendo assim, é importante compreendermos melhor a sua variação comportamental nos sistemas naturais, e seu papel na reprodução sexuada vegetal, a ponto de subsidiar ações eficazes para a proteção dessas abelhas e de seus habitats (Giannini *et al.*, 2015).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMBRUSTER, W. S. *et al.* **Pollination of *Dalechampia magnoliifolia* (Euphorbiaceae) by male euglossine bees.** American Journal of Botany, v. 76, n. 9, p. 1279–1285, 1989.
- ARMBRUSTER, W. S.; MUCHHALA, N. **Associations between floral specialization and species diversity: Cause, effect, or correlation?** Evolutionary Ecology, v. 23, n. 1, p. 159–179, 2009.
- AUSTIN, M.W.; DUNLAP, A.S. **Intraspecific Variation in Worker Body Size Makes North American Bumble Bees (*Bombus spp.*) Less Susceptible to Decline.** The American Naturalist. Vol. 194, No. 3, 2019.
- BARRETT, S.C.H. **The evolution of plant sexual diversity.** Nature Reviews Genetics, v. 3, n. 4, p. 274–284, 2002.
- BARTOMEUS, I. *et al.* **Historical changes in northeastern US bee pollinators related to shared ecological traits.** Proc Natl Acad Sci USA 110:4656–4660, 2013.
- BENAVIDES, M.L.A. **Aspectos da biologia reprodutiva de *Bombus morio* (Swederus) e *Bombus atratus* Franklin (Hymenoptera, Apidae).** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2008.
- BJÖRKLUND, M. **Be careful with your principal components.** Evolution, v. 73, n. 10, p. 2151–2158, 2019.
- BOWERS, Karen A. W. **The Pollination Ecology of *Solanum rostratum* (Solanaceae).** American Journal of Botany, v. 62, n. 6, p. 633, 1975.
- BUCHMANN, S.L. **Buzz pollination in angiosperms.** In Handbook of experimental pollination (C.E. Jones & R.J. Little, eds.). Van Nostrand Reinhold New York p. 73–113, 1983.
- BUCHMANN, S.L. **Bees Use Vibration to Aid Pollen Collection from Non-Poricidal Flowers.** Journal of the Kansas Entomological Society. Vol. 58, No. 3, pp. 517–525, 1985.
- CANE, J. **Estimation of Bee Size Using Intertegular Span (Apoidea).** Journal of the Kansas Entomological Society, 60(1), 145–147, 1987.
- CORE TEAM, R: **A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2021.. Disponível em: <<https://www.Rproject.org>>. Acesso em: novembro 2021
- CHOLE, H. *et al.* **Body size variation in bees: regulation, mechanisms, and relationship to social organization.** Current Opinion in Insect Science, 2019.

- CRAWLEY, M. J. **The R book**. John Wiley & Sons, p. 569-591, 2007.
- COCROFT, R. B. *et al.* **Variation in plant substrates and its consequences for insect vibrational communication**. *Ethology*, v. 112, n. 8, p. 779-789, 2006.
- DAILY, G. **Nature's Services: Societal Dependence on Natural Ecosystems**. Island Press, Washington, DC, 1997.
- DE LUCA, P. A. *et al.* **Variability in bumblebee pollination buzzes affects the quantity of pollen released from flowers**. *Oecologia*, 172:805-816, 2013.
- DE LUCA, P. A. *et al.* **Comparison of pollination and defensive buzzes in bumblebees indicates species-specific and context-dependent vibrations**. *Naturwissenschaften*, v. 101, n. 4, p. 331-338, 2014.
- DE LUCA, P. A. *et al.* **How well do acoustic recordings characterize properties of bee (*Anthophila*) floral sonication vibrations?** *Bioacoustics: The International Journal of Animal Sound and Its Recording*, 2018.
- DE LUCA, P. A. *et al.* **Does body size predict the buzz-pollination frequencies used by bees?** *Ecology and Evolution*, v. 9, n. 8, p. 4875–4887, 2019.
- ENGLE, C.; BAUM, K. **Can You Bee-lieve it? The Intertegular Span of Bees**. Howard Hughes Medical Institute, 2017.
- FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **Principles of pollination ecology**, 3rd edn. London: Pergamon Press, 1979.
- FRANÇOSO, E. **Filogenia de *Bombus morio* e *B. pauloensis* (Hymenoptera, Apidae)**. Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2015.
- FREITAS, B. M. *et al.* **Polinização agrícola por insetos no Brasil: um Guia para Fazendeiros, Agricultores, Extensionistas, Políticos e Conservacionistas**. Universität, 2020.
- GARÓFALO, C. A. **Bionomics of *Bombus* (*Fervidobombus*) *morio* 2. Body size and length of life of workers**. *Journal of Apicultural Research*, p. 130-136, 1978.
- GEGEAR, R.J.; LAVERTY, T.M. **The effect of variation among floral traits on the flower constancy of pollinators**. *Cognitive Ecology of Pollination: Animal Behavior and Floral Evolution*. Cambridge University Press, 2001.
- GIANNINI, T. C. *et al.* **Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions**. *Apidologie*, v. 46, n. 2, p. 209-223, 2015.
- GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. **Evolution of Flower Structures and Pollination in Neotropical Cassiinae (Caesalpiniaceae) Species**. *Phyton (Austria)*, v. 28, n. 2, p. 293–320, 1988.

- GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. **Life in the Cerrado: a South America Tropical Seasonal Ecosystem**. Vol. 2, 2006.
- GOULSON, D. *et al.* **Can alloethism in workers of the bumblebee, *Bombus terrestris*, be explained in terms of foraging efficiency?** *Animal Behaviour* 64:123-130, 2002.
- GOULSON, D. **Bumblebees: Their behaviour and ecology**. Oxford, UK: Oxford University Press, 2003.
- GOULSON, D. *et al.* **Decline and conservation of bumble bees**. *Annu Rev Entomol* 53:191–208, 2008.
- GREENLEAF, S. S. *et al.* **Bee foraging ranges and their relationship to body size**. *Oecologia*, 153:589-596, 2007.
- HARDER, L.D.; THOMSON, J.D. **Evolutionary options for maximizing pollen dispersal of animal-pollinated plants**. *The American Naturalist*. Vol. 133, No.3, 1989.
- IRWIN, H.S.; BARNEBY, R.C. **The American Cassiinae: a synoptical revision of Leguminosae – tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World**. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 35: 1–918, 1982.
- JAUKER, Frank; SPECKMANN, Martin; WOLTERS, Volkmar. **Intra-specific body size determines pollination effectiveness**. *Basic and Applied Ecology*, v. 17, n. 8, p. 714-719, 2016.
- JESSON, L.K; BARRET S.C.H. **The comparative biology of mirror-image flowers**. *International Journal of Plant Sciences* 164: S237–S249, 2003.
- KAPUSTJANSKIJ, A. *et al.* **Bigger is better: implications of body size for flight ability under different light conditions and the evolution of alloethism in bumblebees**. *Functional Ecology* 21:1130-1136, 2007.
- KEMBEL, S. W. *et al.*, **Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology**, *Bioinformatics*, Volume 26, Pages 1463–1464, 2010.
- KIMSEY, L. S. **The behavioural and structural aspects of grooming and related activities in euglossine bees (Hymenoptera: Apidae)**. *Journal of Zoology*, v. 204, n. 4, p. 541-550, 1984.
- KING, M. J. **Buzz foraging mechanism in bumble bees**. *J Apic. Res* 32:41–49, 1993.
- KOCH, L. *et al.* **To be on the safe site–Ungroomed spots on the bee’s body and their importance for pollination**. *PloS one*, v. 12, n. 9, p. e0182522, 2017.
- LEWIS, G. P. *et al.* **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005.

- LICHTENBERG, E. M. *et al.* **Costs and benefits of alternative food handling tactics help explain facultative exploitation of pollination mutualisms.** *Ecology*, v. 99, n. 8, p. 1815-1824, 2018.
- LIMA, T.D.D. **Como duas espécies de *Chamaecrista* lidam com o dilema do pólen? Variação no tamanho floral e na estratégia reprodutiva mediada pelas abelhas.** Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu - SP, 2019.
- MACIOR L. W. **Pollen-foraging behavior of *Bombus* in relation to pollination of nototribic flowers.** *American Journal of Botany* 54: 359–364, 1967.
- MESQUITA-NETO, J. N. *et al.* **Flowers with poricidal anthers and their complex interaction networks- Disentangling legitimate pollinators and illegitimate visitors.** *Funct Ecol.*, 00:1–12, 2018.
- MESQUITA-NETO, J. N. *et al.* **Minimum size threshold of visiting bees of a buzz-pollinated plant species: consequences for pollination efficiency.** *American Journal of Botany*, 2021.
- MICHENER, C.D. **The Bees of the World.** 2nd Edition, John Hopkins University Press, Baltimore, 2007.
- MINNAAR, C. *et al.* **Plant–pollinator interactions along the pathway to paternity.** *Annals of Botany*, v. 123, n. 2, p. 225-245, 2019.
- NOGUEIRA, A., *et al.* **Relationship of floral morphology and development with the pattern of bee visitation in a species with pollen-flowers, *Chamaecrista desvauxii* (Fabaceae).** *Botanical Journal of the Linnean Society* 1: 1-20, 2018.
- PERSSON, A. S.; SMITH, H. G. **Bumblebee colonies produce larger foragers in complex landscapes.** *Basic & Applied Ecology* 12:695-702, 2011.
- QUINALHA, M.M. *et al.* **Effect of mutualistic and antagonistic bees on floral resources and pollination of a savanna shrub.** *Flora*, 232:30-38, 2017.
- RANDO, J.G., *et al.* **Chamaecrista in Flora do Brasil 2020.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB621875>>. Acesso em: 09 nov. 2021.
- RECH, A. R. *et al.* (Ed.). **Biologia da polinização.** Rio de Janeiro: Projecto Cultural, 2014.
- ROSI-DENADAI, C. A. *et al.* **Buzz-pollination in Neotropical bees: genus-dependent frequencies and lack of optimal frequency for pollen release.** *Insect Science*, 2018.
- RUSSELL, A. L. *et al.* **Pollinator effectiveness is affected by intraindividual behavioral variation.** *Oecologia*, v. 197, n. 1, p. 189-200, 2021.

- SAKAI, S. **A review of brood-site pollination mutualism: plants providing breeding sites for their pollinators.** The Botanical Society of Japan and Springer-Verlag, 115:161-168, 2002.
- SCHUPP, E.W. *et al.* **A general framework for effectiveness concepts in mutualisms.** Ecology Letters, 20: 577-590, 2017.
- SOARES, S.A. *et al.* **Pollination of *Adenocalymma bracteatum* (Bignoniaceae): Floral Biology and Visitors.** Neotropical Entomology 39(6):941-948, 2010.
- SOLÍS-MONTERO, L.; VALLEJO-MARÍN, M. **Does the morphological fit between flowers and pollinators affect pollen deposition? An experimental test in a buzz-pollinated species with anther dimorphism.** Ecology and Evolution, v. 7, n. 8, p. 2706–2715, 2017.
- SOLÍS-MONTERO, L. *et al.* **High incidence of pollen theft in natural populations of a buzz-pollinated plant.** Arthropod-Plant Interactions, v. 9, n. 6, p. 599–611, 2015.
- SOUZA, V.C.; BORTOLUZZI, R.L.C. ***Chamaecrista* in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015a. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB27931>>. Acesso em: 30/04/2020.
- SOUZA, V.C.; BORTOLUZZI, R.L.C. ***Chamaecrista* in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015b. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22876>>. Acesso em: 02/10/2019.
- STEBBINS, G.L. **Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms I: pollination mechanisms.** Annual Review of Ecology and Systematics 1: 307±326, 1970.
- SUEUR, J. **Sound analysis and synthesis with R.** Culemborg, the Netherlands: Springer, 2018.
- SWITZER, C.M. *et al.* **Shakers and head bangers: differences in sonication behavior between Australian *Amegilla murrayensis* (blue-banded bees) and North American *Bombus impatiens* (bumblebees).** Arthropod-Plant Interactions 10:1-8, 2016.
- TAVARES, P. R. A. *et al.* **Pollen availability and behavior of visiting bees of *Solanum lycocarpum* A. St. Hill (Solanaceae).** Entomological News, v. 127, n. 4, p. 375-385, 2018.
- THOMPSON, H. M. **Assessing the exposure and toxicity of pesticides to bumblebees (*Bombus* sp.).** Apidologie 32:305–321, 2001.

- THORP, R. W. **The collection of pollen by bees**. In: Pollen and pollination. Springer, Vienna, p. 211-223, 2000.
- VALADÃO-MENDES, L. B. **Interações mutualistas ao longo da ontogenia de uma espécie de leguminosa: bactérias fixadoras de nitrogênio, formigas protetoras e abelhas polinizadoras**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - Campus Botucatu/SP, 2018.
- VALLEJO-MARÍN, M. **Buzz pollination: studying bee vibrations on flowers**. New Phytologist, 224:1068-1074, 2019.
- VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern Applied Statistics with S**. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0, 2002.
- VIVARELLI, D. *et al.* **Small-size bees reduce male fitness of the flowers of *Ononis masquillierii* (Fabaceae), a rare endemic plant in the northern Apennines**. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 165, n. 3, p. 267-277, 2011.
- VOGEL, S. **Evolutionary shifts from reward to deception in pollen flowers**. In **The pollination of flowers by insects** (ed. AJ Richards). London, UK: Academic Press, 1978.
- WHALEN, M. D. **Reproductive Character Displacement and Floral Diversity in *Solanum* Section *Androceras***. American Society of Plant Taxonomists. Systematic Botany, v. 3, No. 1, pp. 77-86, 1978.
- WHITEHORN, P. R. *et al.* **Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production**. Science 336:351–352, 2012.
- WILLMER, P.G.; FINLAYSON, K. **Big bees do a better job: intraspecific size variation influences pollination effectiveness**. Journal of Pollination Ecology, 14(23), pp 244-254, 2014.
- WINFREE, R. *et al.* **A meta-analysis of bees’ responses to anthropogenic disturbance**. Ecology 90:2068–2076, 2009.
- WOŁOWSKI, M. *et al.* **Relatório Temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil**. Plataforma Brasileira de Biodiversidade e Serviços Ecosistêmicos (BPBES) & Rede Brasileira de Interações Planta-Polinizador (REBIPP), 2019. Disponível em:< https://www.bpb.es.net.br/wp-content/uploads/2019/03/BPBES_CompletoPolinizacao-2.pdf> em 06/11/2019.
- ZYCH, M. *et al.* **The most effective pollinator revisited: pollen dynamics in a spring-flowering herb**. Arthropod-Plant Interactions, 2013.

TABELAS

Tabela 1 – Relação entre os eixos de comportamento das abelhas *Bombus morio* (variáveis respostas) e o seu tamanho corporal, em milímetros, medido em largura torácica, largura abdominal e distância intertegular. A relação entre o Eixo Principal 1 (PC1) e a largura torácica obteve maior relação ($b_{\text{std}} = -0.65 \pm 0.28$). Enquanto que o Eixo Principal 2 (PC2) obteve maior relação com a largura abdominal ($b_{\text{std}} = -0.52 \pm 0.16$). N amostral = 59 flores.

Variáveis respostas (Eixos de comportamento)	Variáveis preditoras (Tamanho da abelha)	Coefficiente de estimativa padronizado $\pm SE$	Estatística F	p	Gráficos
PC1	Largura torácica	-0.65 ± 0.28	5.5	0.02	Fig. 3A
	Largura abdominal	-0.55 ± 0.28	3.7	0.058	Fig. 3C
	Distância intertegular	-0.48 ± 0.28	2.8	0.097	Apêndice S11A
PC2	Largura torácica	-0.39 ± 0.17	5.3	0.02	Fig. 3B
	Largura abdominal	-0.52 ± 0.16	10.1	0.002	Fig. 3D
	Distância intertegular	-0.32 ± 0.17	3.4	0.069	Apêndice S11B

Tabela 2 – Relação entre o tamanho corporal das abelhas *Bombus morio* e os componentes de seu comportamento com as variáveis relacionadas à eficiência da polinização (i.e. grãos de pólen no estigma, formação de fruto e formação de sementes viáveis) e a remoção de grãos de pólen das anteras de *Chamaecrista latistipula*. As linhas em branco indicam os modelos referentes ao comportamento e as cinzas, os modelos relacionados ao tamanho, em milímetros.

* Os dados de proporção foram analisados a partir de uma Regressão Logística com Erros Binomiais proposta por Crawley, 2007. A proporção dessas variáveis foi realizada com o auxílio da função “cbind” do Software R.

Variáveis respostas (Eficiência na polinização e remoção de pólen)	Variáveis preditoras (tamanho da abelha e comportamento)	Distribuição probabilística	Coefficiente de estimativa padronizado $\pm$ SE	Estatística z ou t	p	Gráficos
Grãos de pólen no estigma	PC1	Binomial negativo	-0.02 $\pm$ 0.08	-0.27	0.79	Apêndice S12A
	PC2		-0.06 $\pm$ 0.08	-0.72	0.47	Apêndice S12B
Grãos de pólen no estigma	Largura torácica	Binomial negativo	0.09 $\pm$ 0.08	1.22	0.22	Fig. 4A
Formação de fruto	PC1	Binomial	-0.45 $\pm$ 0.41	-1.08	0.28	Apêndice S13A
	PC2		-0.38 $\pm$ 0.36	-1.06	0.29	Apêndice S13B
Formação de fruto	Largura torácica	Binomial	0.59 $\pm$ 0.45	1.32	0.18	Fig. 4B
Sementes viáveis	PC1	Binomial*	-0.07 $\pm$ 0.19	-0.37	0.71	Apêndice S14A
	PC2		0.07 $\pm$ 0.20	0.35	0.72	Apêndice S14B
Sementes viáveis	Largura torácica	Binomial*	0.29 $\pm$ 0.19	1.53	0.13	Fig. 4C
Pólen removido	PC1	Binomial*	-0.08 $\pm$ 0.10	-0.74	0.46	Apêndice S15A
	PC2		-0.11 $\pm$ 0.09	-1.15	0.25	Apêndice S15B
Pólen removido	Largura torácica	Binomial*	0.04 $\pm$ 0.10	0.38	0.71	Fig. 4D

FIGURAS

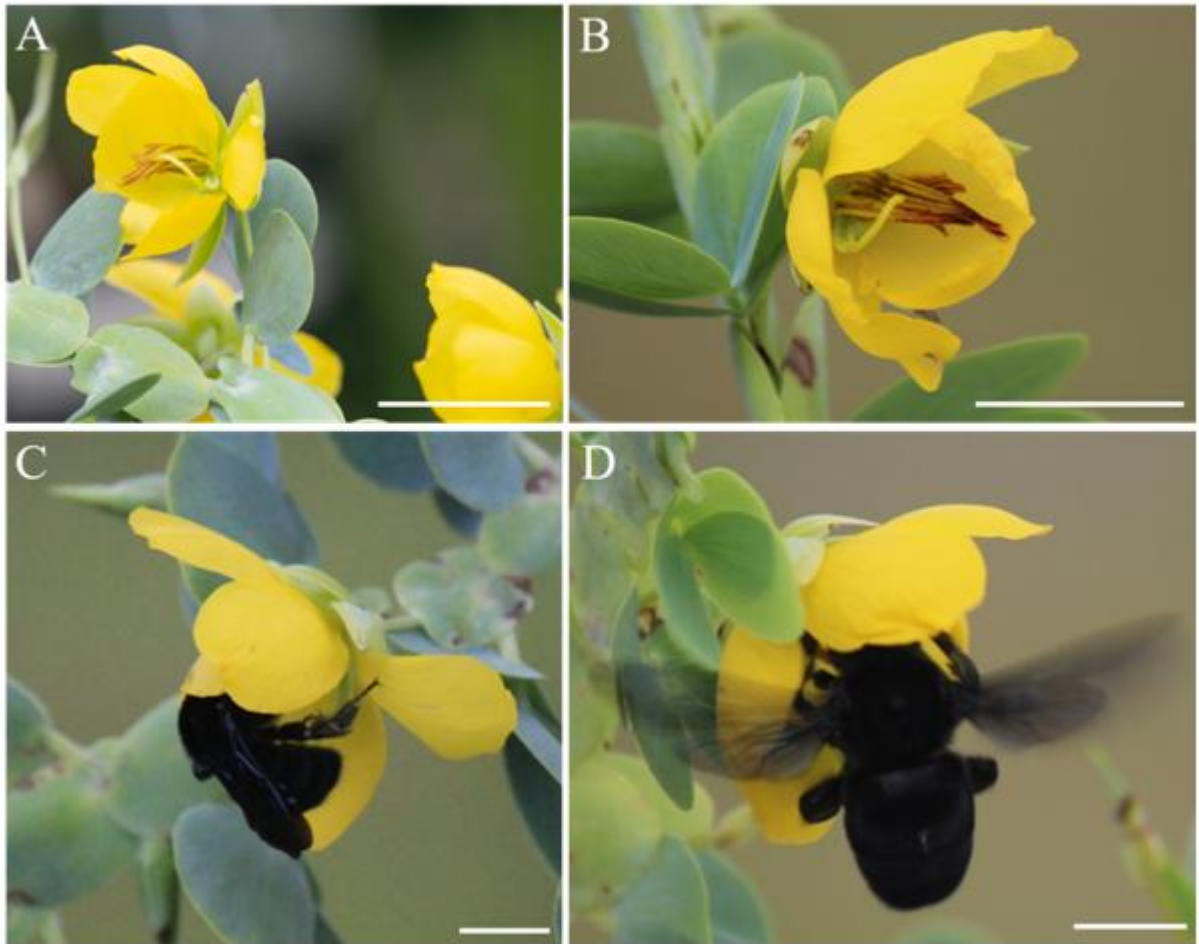


Figura 1. Flores de *Chamaecrista latistipula* e a visita das abelhas *Bombus morio* na população que estudada. A, B) Detalhe das flores de *Chamaecrista latistipula*; C) indivíduo da espécie *Bombus morio* com tamanho corporal menor e (D) outro indivíduo com tamanho corporal maior. Barras de escalas: A) 2,0cm; B) 2,0cm; C) 1,0cm e D) 1,0cm.

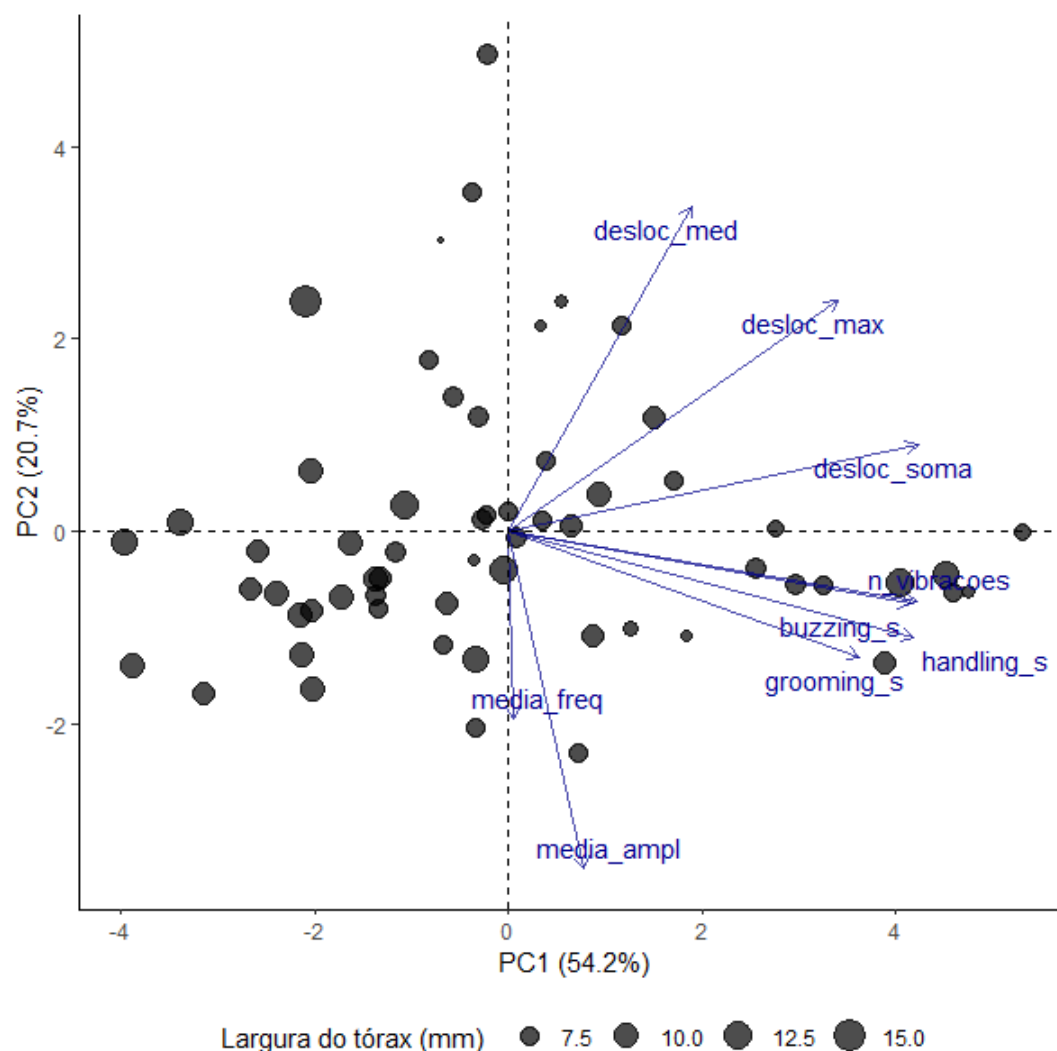


Figura 2. Análise de Componentes Principais (PCA) das variáveis que compõem o comportamento das abelhas *Bombus morio* nas flores de *Chamaecrista latistipula*. Os Eixos Principais 1 e 2 explicam 54% e 20,7% da proporção da variância, respectivamente. As variáveis de comportamento das abelhas *B. morio* são compostas por picos de frequência, picos de amplitude relativa, *grooming time*, *buzzing time*, *handling time*, número de vibrações, deslocamento angular máximo, somado e médio. Os pontos do gráfico diferem-se em diâmetro devido à largura torácica das abelhas *B. morio*, em milímetros.

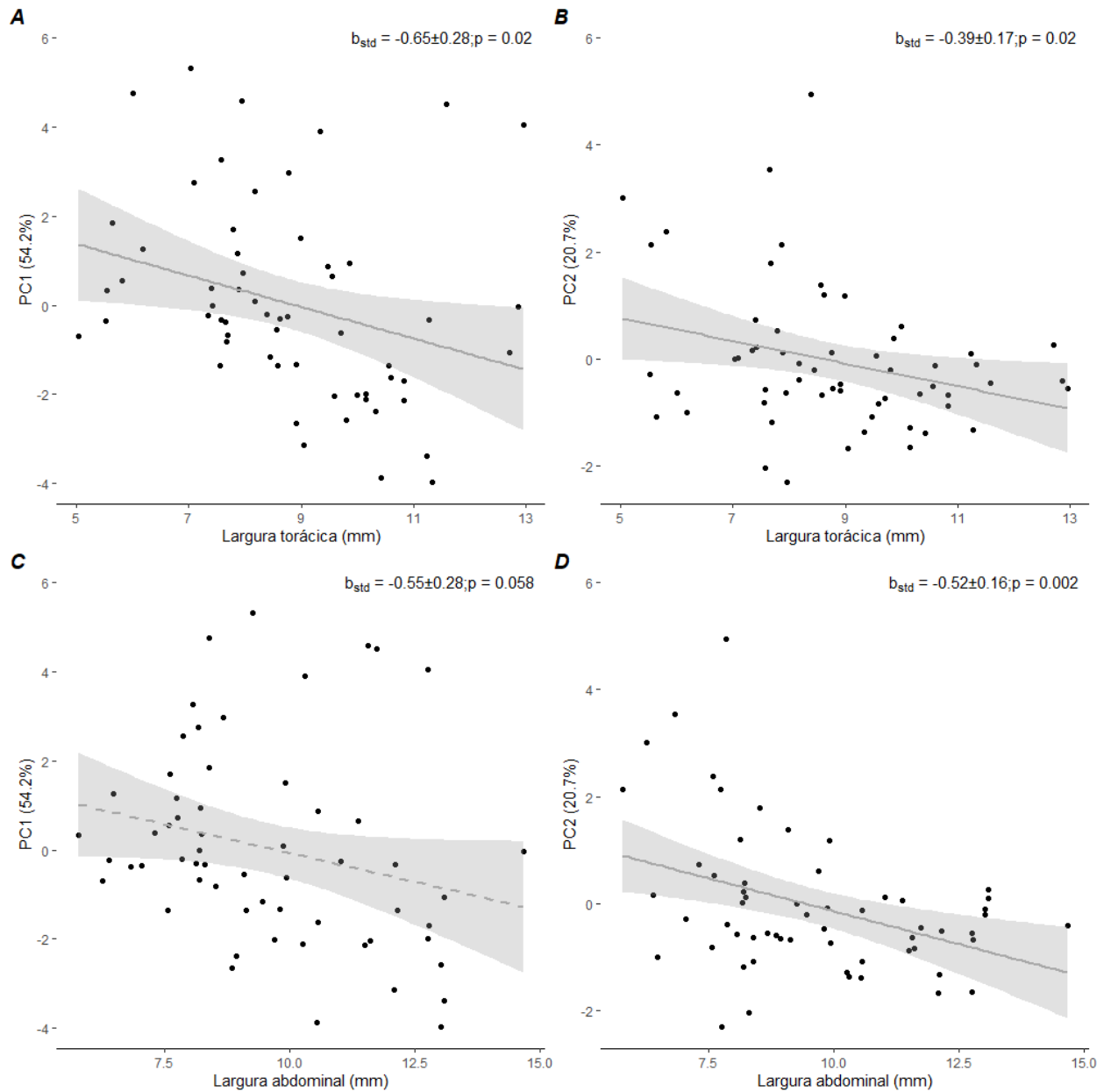


Figura 3: Relação entre o tamanho corporal das abelhas *Bombus morio* e os Eixos Principais 1 e 2 de comportamento. A) Relação entre a largura torácica e o Eixo Principal 1 (PC1); B) Relação entre a largura torácica e o Eixo Principal 2 (PC2); C) Relação entre a largura abdominal e o Eixo Principal 1 (PC1); D) Relação entre a largura abdominal e o Eixo Principal 2 (PC2). A linha de tendência tracejada representa valores de p acima de 0.05 e a linha contínua, valores de p abaixo de 0.05. O sombreamento cinza representa o intervalo de confiança em torno da linha de tendência. b_{std} = coeficiente de estimativa padronizado $\pm$ erro padronizado.

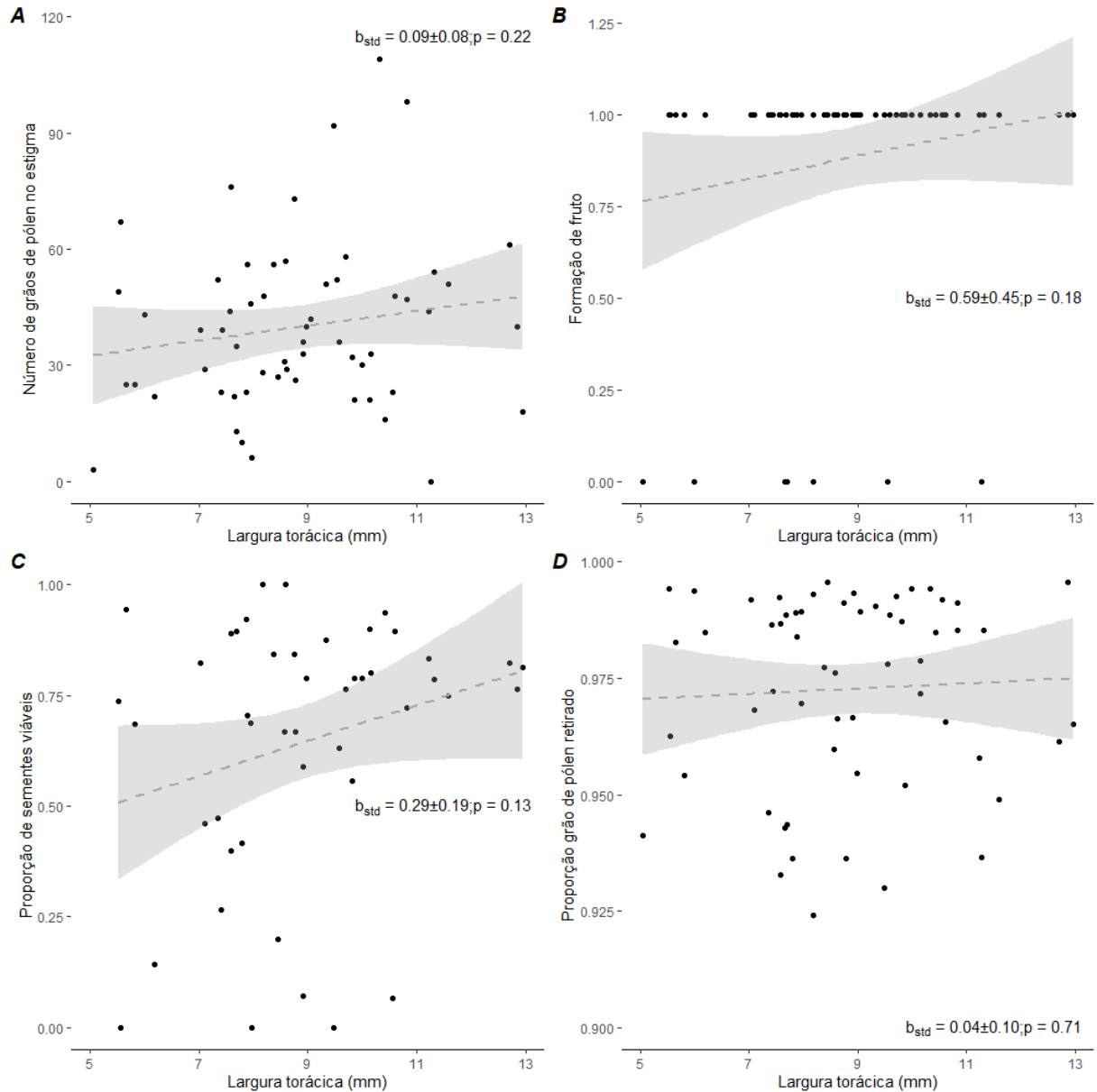


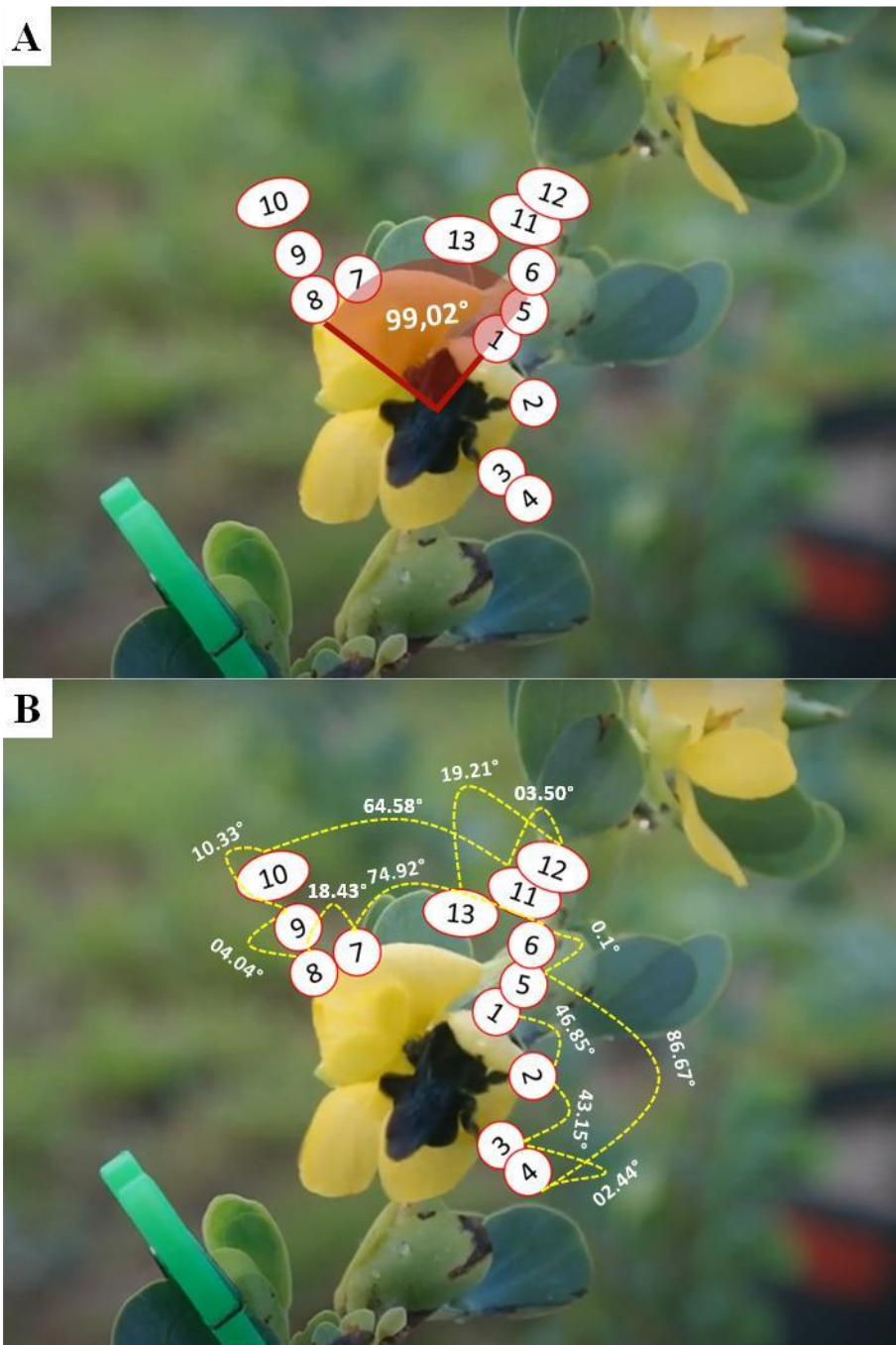
Figura 4: Relação entre a largura torácica, em milímetros, das abelhas *Bombus morio*, os componentes da eficiência da polinização e a remoção de grão de pólen das anteras de *Chamaecrista latistipula*. A) Relação entre a largura torácica e o número de grãos de pólen no estigma; B) Relação entre a largura torácica e a formação de frutos; C) Relação entre a largura torácica e a proporção de sementes viáveis nos frutos formados; D) Relação entre a largura torácica e a proporção de grãos de pólen retirados das anteras visitadas. A linha de tendência tracejada representa valores de p acima de 0.05 e a linha contínua, valores de p abaixo de 0.05. O sombreamento cinza representa o intervalo de confiança em torno da linha de tendência. b_{std} = coeficiente de estimativa padronizado $\pm$ erro padronizado.

APÊNDICES

APÊNDICE S1. População de *Chamaecrista latistipula* na Universidade Federal do ABC (UFABC).



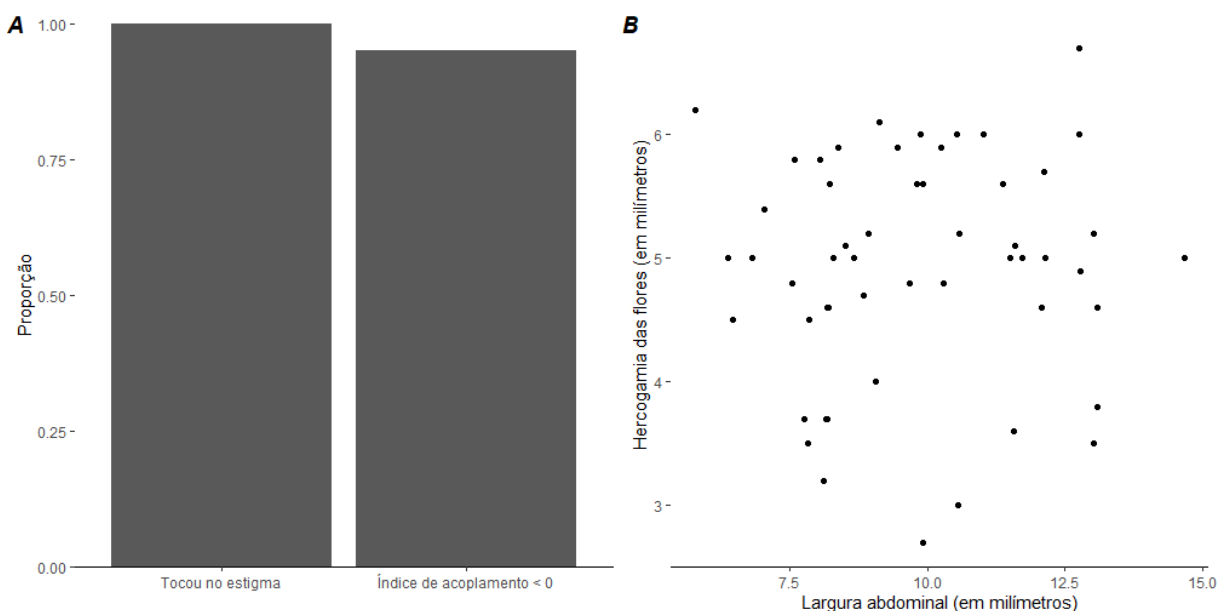
APÊNDICE S2. Descritores de deslocamento angular das abelhas *Bombus morio* nas flores de *Chamaecrista latistipula*. A numeração representa a posição da abelha quando emitiu cada pulso de vibração durante a visita, sendo, neste caso, 13 pulsos de vibração no total. A) Representação do deslocamento angular máximo (em graus), o qual refere-se ao maior deslocamento da visita representado pela mancha vermelha no oitavo pulso de vibração. B) Representação do deslocamento angular somado (em graus), o qual soma-se todos os deslocamentos efetuados entre os pulsos de vibração em uma mesma visita na flor. A linha tracejada amarela representa a movimentação da abelha a cada vibração e o ângulo acima de cada linha descreve o deslocamento efetuado entre pulsos de vibração. A divisão da somatória dos deslocamentos pelo número de vibrações menos um refere-se ao deslocamento angular médio entre pulsos de vibração. Neste caso, o deslocamento angular médio é igual a $374.22^\circ \div (13-1)$, correspondendo a 31.19° de deslocamento médio entre os pulsos de vibração.



APÊNDICE S3. Descrição dos componentes de comportamento das abelhas *Bombus morio* nas flores de *Chamaecrista latistipula*. A) Oscilograma de uma visita de *B. morio*, o qual representa o tempo de manuseio da abelha na flor (*handling time*). Os números em vermelho representam os pulsos de vibração (*buzzes*) das abelhas e os números em preto representam o de limpeza da abelha (*grooming time*). B) Representação da soma do tempo de vibração das abelhas *B. morio* nos vários pulsos de vibração aplicados nas anteras das flores (*buzzing time*).



APÊNDICE S4. Relação entre o tamanho das abelhas *B. morio*, a chance de tocar no estigma e a hercogamia das flores de *C. latistipula*. A) Gráfico de proporção de abelhas que tocaram no estigma durante as visitas nas flores de *C. latistipula* e apresentaram o Índice de Acoplamento abaixo de zero (abelhas com a largura abdominal superior à hercogamia da flor); B) Relação entre a largura abdominal das abelhas *B. morio* e a hercogamia das flores de *C. latistipula*.



APÊNDICE S5. Protocolo para contagem de grãos de pólen das anteras poricidas no gênero *Chamaecrista* (Fabaceae) desenvolvido pelo Laboratório de Interações Planta-Animal da Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo-SP, Brasil.

LIPA – Laboratório de Interações Planta-Animal

PROTOCOLO PARA CONTAGEM DE GRÃOS DE PÓLEN DAS ANTERAS PORICIDAS NO GÊNERO CHAMAECRISTA

Autores: Tamiris Daiane Delgado de Lima, Bruna Campos Barbosa e Guilherme Victor Mota
Última versão: 11/11/2021

1) COLETA DO MATERIAL E ARMAZENAMENTO

A coleta do androceu da flor pode ser realizada em botões em estágio de pré-antese para que haja contagem de grãos de pólen em flores virgens ou em flores abertas ensacadas

ainda virgens. Caso o objetivo seja contabilizar os grãos de pólen em flores já visitadas por algum animal, deve-se retirar o androceu com o auxílio de uma pinça após 24h da ocorrência da interação entre o visitante floral e a flor. Após a retirada das anteras, deve-se armazená-las em um tubo eppendorf com fixador FAA 50%, por 24h.

Após as 24h de armazenamento no FAA 50%, deve-se passar o material para um eppendorf com Álcool 70 %. O período de armazenamento das anteras no Álcool 70 % é indefinido.

Obs: Também é possível que haja a retirada do líquido de FAA 50 % com uma pipeta e inserção do Álcool 70 % para que ocorra o reaproveitamento do mesmo eppendorf.

Fixador FAA 50% - compõe-se de formalina (5 ml) + ácido acético (5 ml) + álcool etílico 50 % (90 ml). O etanol produz retração do protoplasma, no entanto o ácido acético o expande; o álcool e a formalina endurecem os tecidos, enquanto o ácido os amacia. O tempo para que ocorra fixação é variável, dependendo do volume da peça a ser fixada e da resistência da mesma à penetração dos reagentes. O tempo mínimo para que ocorra uma boa fixação é de 24 horas. Depois de fixado, o material é estocado em solução de etanol a 70%.

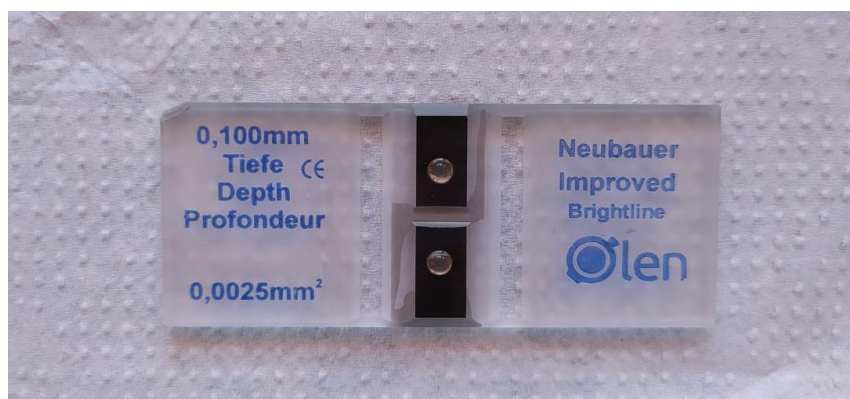
Álcool etílico 70 % - precipita as proteínas e os ácidos nucleicos e dissolve os lipídios. Preparo: álcool etílico absoluto (70 ml) + água destilada (30 ml). A solução de etanol a 70 % não tem vida útil determinada se a solução de etanol for vedada adequadamente (para evitar a evaporação do álcool).

2) PREPARO E CONTAGEM DA SUBAMOSTRA

1. Em um eppendorf novo com o fundo arredondado (2ml), adicione as anteras retiradas do álcool 70 % com o auxílio de uma pinça;
2. Adicione 600 µl de água destilada com Tween²⁰ com o auxílio de uma micropipeta de 100-1000 µl –a solução desse eppendorf será sua solução completa que contém o conjunto de todos os grãos de pólen da sua flor, e de onde você irá retirar alíquotas para estimar os grãos de pólen. **Importante:** *Sempre manter as pipetas na posição vertical durante o seu uso para evitar a contaminação da parte superior da pipeta e perda de solução com os grãos de pólen.*
3. Acrescentar ao eppendorf uma esfera de 0,90 g e agitar a amostra por 3 minutos na velocidade máxima do Vortex. O eppendorf deve ser colocado no Vortex com angulação próxima a 45° para que haja liberação dos grãos de pólen (a amostra deve

estar homogênea). Após os três minutos, retirar a esfera da amostra com o auxílio de uma pinça;

4. Retirar uma subamostra de 10 μl com o auxílio de uma micropipeta de 2-20 μl ajustada para 100. A retirada dessa subamostra deve ser feita com o eppendorf em agitação na velocidade mínima no Vortex, para que haja garantia de que os grãos de pólen não estarão decantados no fundo do eppendorf durante a coleta das alíquotas. Além disso, a subamostra deve ser retirada do meio para o fundo do eppendorf, sem encostar a ponteira da micropipeta no fundo do eppendorf.
5. A subamostra de 10 μl deve ser aplicada em cima da lâmina de vidro da Câmara de Neubauer. Caso a Câmara possua duas lâminas de vidro, colete mais uma subamostra de 10 μl para aplicar neste segundo vidro.



Modelo de Câmara de Neubauer com duas lâminas de vidro. Cada gota representa uma subamostra de 10 μl .

Após a aplicação das subamostras, insira a lamínula. Para auxiliar a fixação da lamínula na Câmara de Neubauer, utilize um pouco de água destilada nas extremidades da câmara (pode-se aplicar a água destilada com os dedos).



Representação de como aplicar a água destilada nas extremidades da lâmina.

Verificar previamente na lupa se os grãos de pólen na subamostra estão homogeneamente distribuídos no campo de visão da Câmara de Neubauer;

A contagem do número de grãos de pólen deve ser realizada com auxílio de microscópio óptico (objetiva de 4x/0.10). Deve-se realizar a contagem dos 9 quadrados/quadrantes maiores de cada vidro da câmara de Neubauer (fotografar os quadrantes);

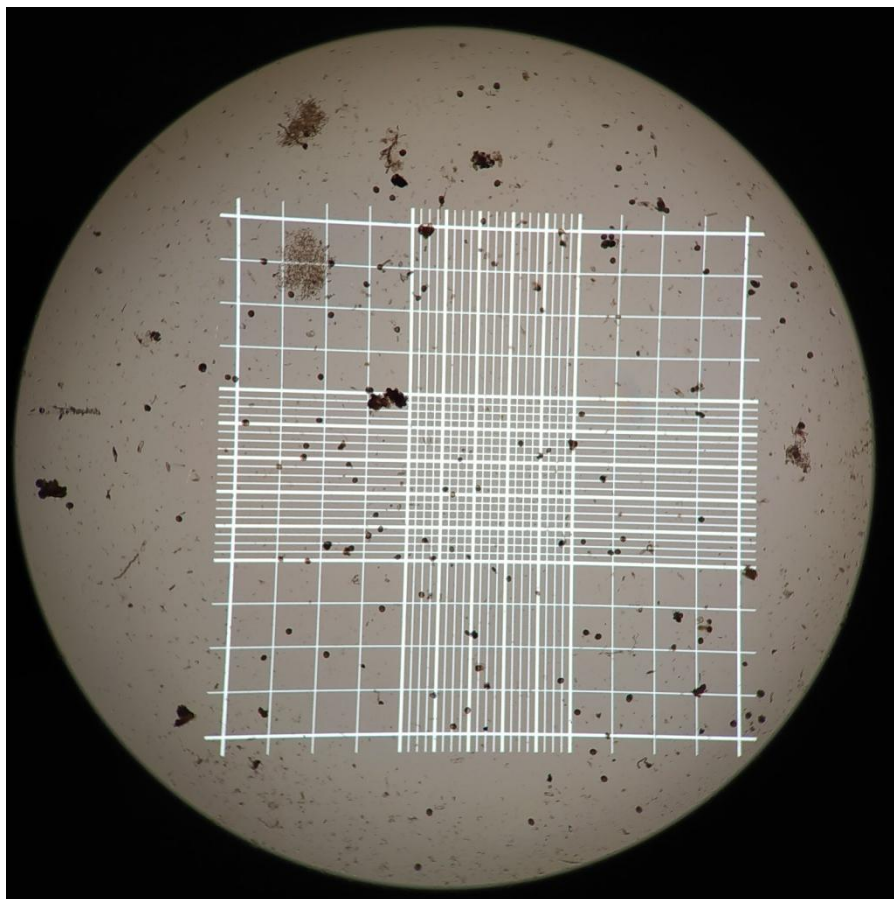


Imagem feita por microscópio óptico (objetiva de 4x/0.10) de uma lâmina de vidro da câmara de Neubauer. É possível observar os 9 quadrados/quadrantes maiores da lâmina de vidro.

Cada quadrante possui suas quatro linhas limites, as quais são mais espessas. Deve-se contar somente os grãos de pólen que estão inseridos dentro do respectivo quadrante a ser contabilizado. Porém, há uma regra em que se escolhe previamente duas dessas quatro linhas limites para contabilizar os grãos de pólen que estejam em cima dessas bordas, para que assim sejam incluídos na contagem desse quadrante. Os grãos de pólen que caírem sobre as linhas das outras duas bordas não serão contabilizados.

3) CÁLCULO PARA DETERMINAÇÃO DE PARTÍCULAS

Para estimar o número de grãos de pólen existentes na solução completa de 600 μl (em geral, em uma flor), contabilizaremos a número de grãos de pólen dos 9 quadrantes da lâmina de vidro da Câmara de Neubauer.

Cada quadrante possui 1 mm^2 de área e a profundidade da câmara é de 0,1 mm. A soma das áreas dos 9 quadrantes corresponde a 9 mm^2 . Portanto, o volume da lâmina de vidro corresponde a 9 $\text{mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = \mathbf{0,9 \text{ mm}^3}$.

As unidades mm^3 e μl são equivalentes, portanto, o volume total da lâmina é de 0,9 μl . Portanto, todos os grãos de pólen contabilizados nos nove quadrantes (N) estão dispersos em 0,9 μl . Dessa forma, é possível aplicar uma regra de três para obter o número total de grãos de pólen (P) na solução completa de 600 μl .

$$N - 0,9\mu\text{l}$$

$$P - 600\mu\text{l}$$

$$0,9x = 600 \cdot N$$

$$P = (600 \cdot N) \div 0,9$$

Cada lâmina de vidro com 9 quadrantes corresponderá a contagem de grãos de pólen de uma alíquota (pseudoréplica) da solução completa de uma flor. Portanto, se a contagem ocorrer em uma Câmara de Neubauer com dois lados de amostragem, será possível quantificar duas alíquotas (pseudoréplicas) em cada preparação Câmara de Neubauer. No total, deve-se contabilizar, pelo menos, 6 pseudoréplicas, de cada material/flor, para reduzir o efeito de erros de manipulação do pesquisador sobre a estimativa de grãos de pólen por flor.

4) VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DA ESTIMATIVA DOS GRÃOS DE PÓLEN

Para que haja a exclusão de possíveis outliers durante as contagens, deve-se aplicar o Coeficiente de Variação nas 6 pseudoréplicas contabilizadas. O Coeficiente de Variação é calculado da seguinte maneira:

$$CV = (\text{desvio padrão das 6 pseudoréplicas} \div \text{médias das 6 pseudoréplicas}) \times 100$$

For menor ou igual a 15% → baixa dispersão: dados homogêneos, maior confiança na sua estimativa!

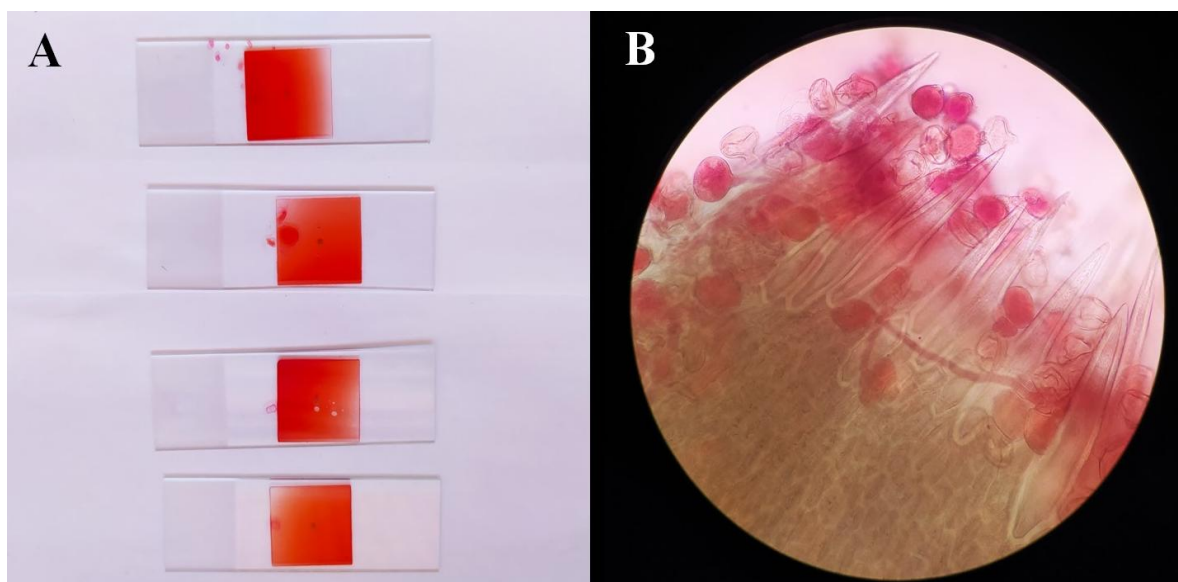
For entre 15 e 35% → média dispersão, se tiver tempo refaça algumas alíquotas!

For maior que 30% → alta dispersão: dados heterogêneos, exclua duas alíquotas em que os valores estejam mais distantes da média, e refaça duas alíquotas. Recalcule o coeficiente de variação, se for inferior a 15 por certo, problema resolvido!

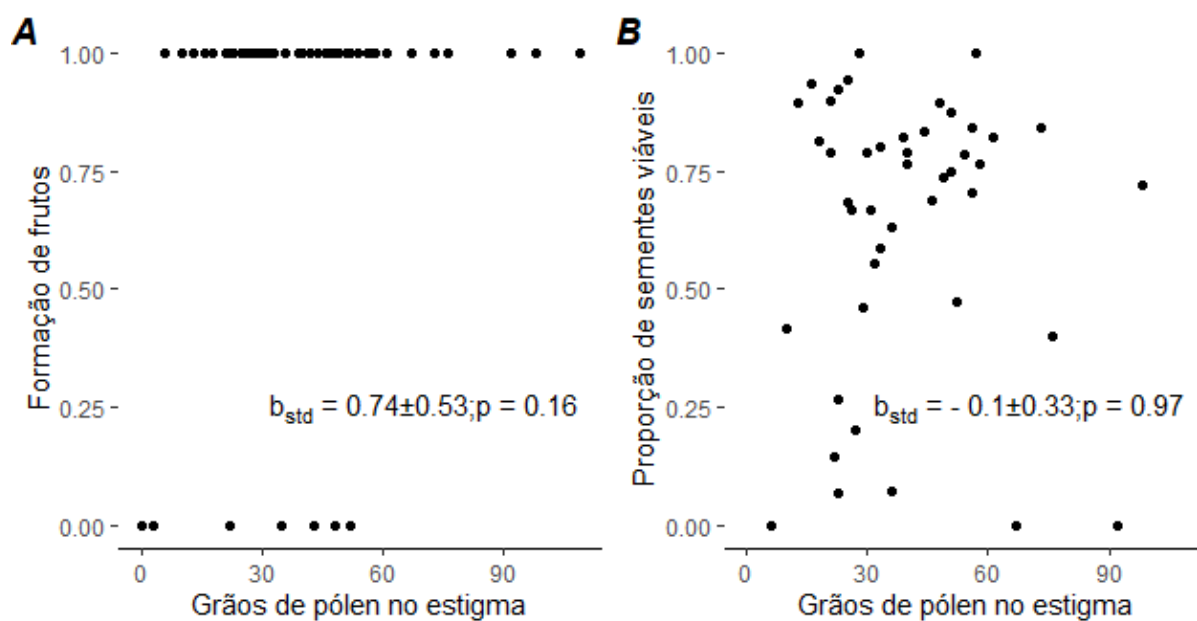
Para entender um pouco mais sobre o Coeficiente de Variação:

https://www.google.com/url?q=https://mundoeducacao.uol.com.br/matematica/coeficiente-variacao.htm&sa=D&source=editors&ust=1636486389308000&usg=AOvVaw2cB85xLgUm_OY_pIRleLKF

APÊNDICE S6. Amostras de estigma das flores de *Chamaecrista latistipula* visitadas por *Bombus morio* durante este estudo. A) Lâminas prontas de estigma das flores de *C. latistipula* com o corante carmin acético para corar os grãos de pólen; B) Grãos de pólen no estigma das flores de *C. latistipula* em microscópio óptico (objetiva de 40x/0.10).



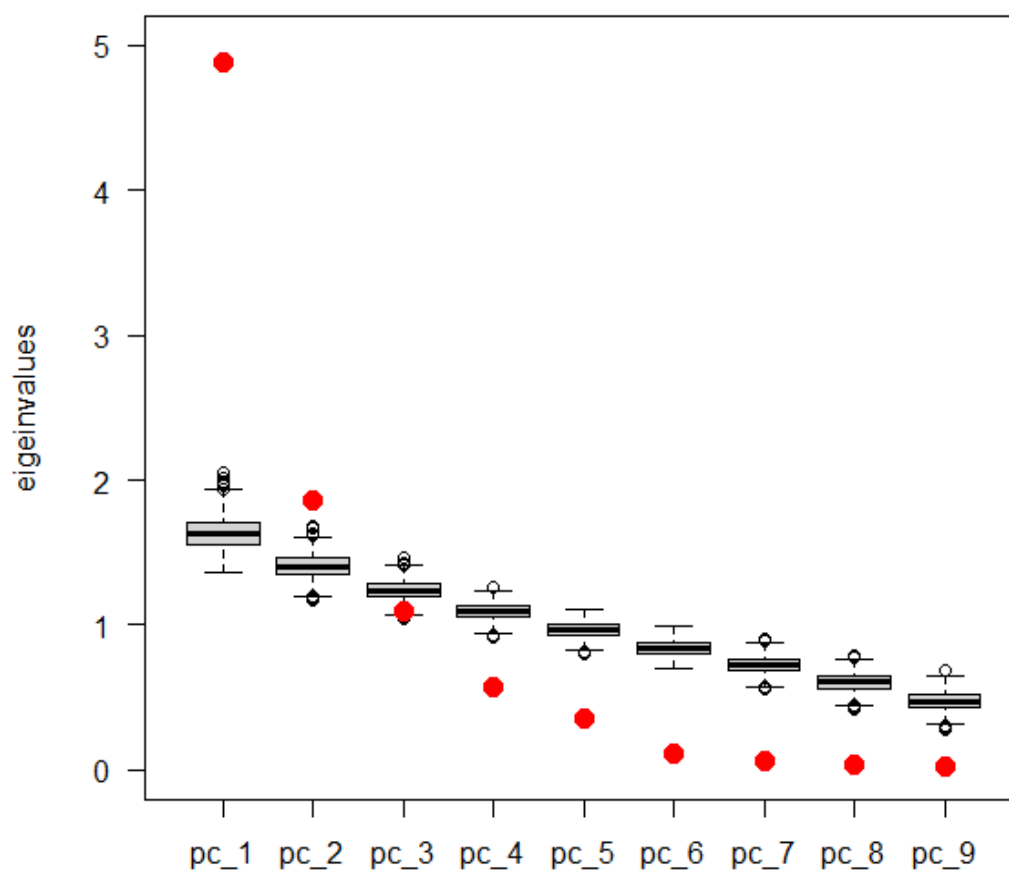
APÊNDICE S7. Relação entre o número de grãos de pólen depositados no estigma das flores de *Chamaecrista latistipula* com A) formação de frutos e B) a proporção de sementes viáveis advindas dos frutos formados.



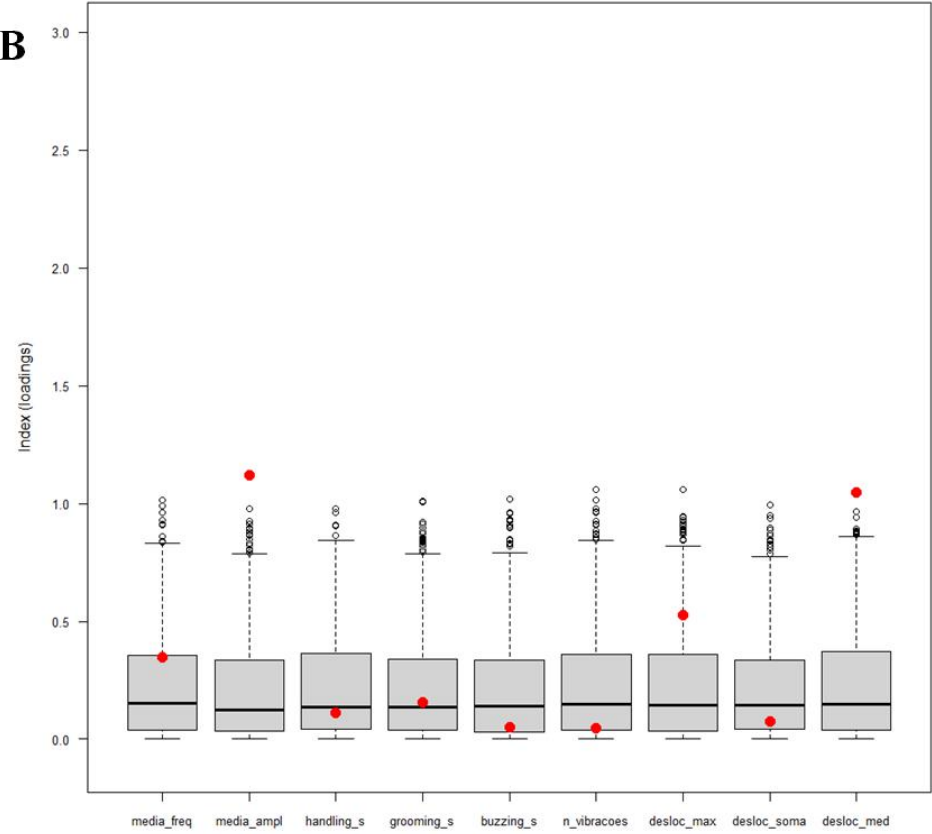
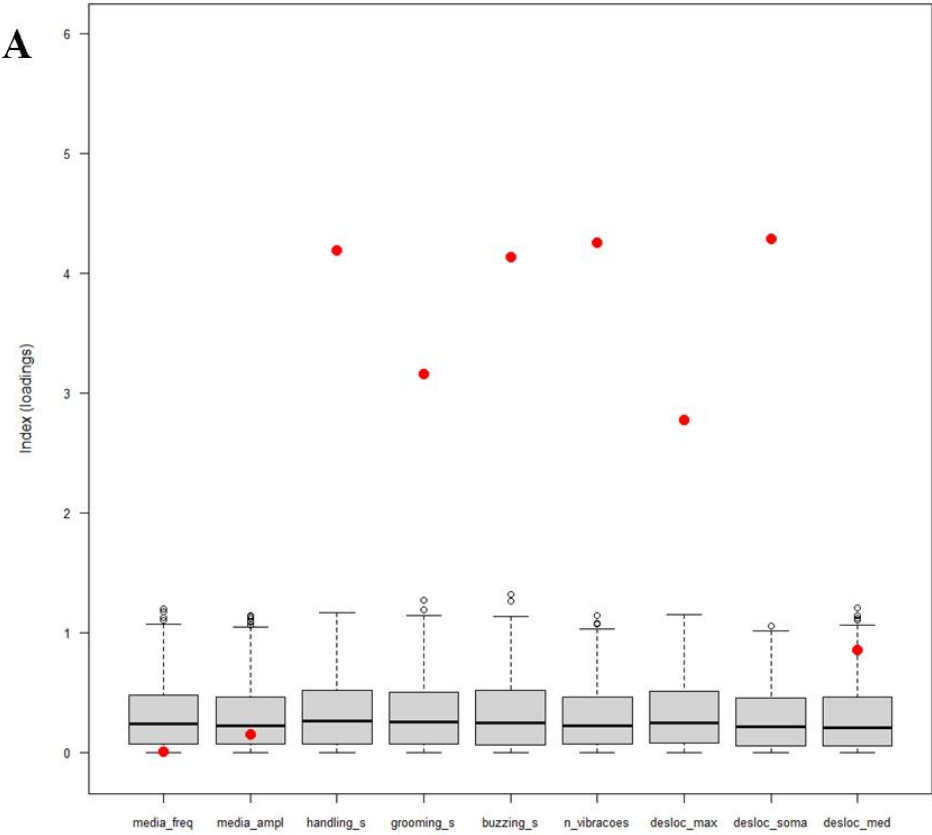
APÊNDICE S8. Autovalores e cargas dos Componentes Principais (PC1 e PC2).

	Componentes principais	
	PC1	PC2
Autovalores	4.877	1.865
Proporção da variância	0.542	0.207
Proporção cumulativa	0.542	0.749
Cargas		
Média do pico de frequência	0.006	- 0.315
Média do pico de amplitude relativa	0.079	- 0.568
<i>Handling time</i>	0.419	- 0.179
<i>Grooming time</i>	0.364	- 0.211
<i>Buzzing time</i>	0.417	- 0.121
Número de pulsos de vibração	0.423	- 0.117
Deslocamento angular máxima	0.341	0.389
Deslocamento angular somada	0.424	0.146
Deslocamento angular médio entre pulsos de vibração	0.189	0.548

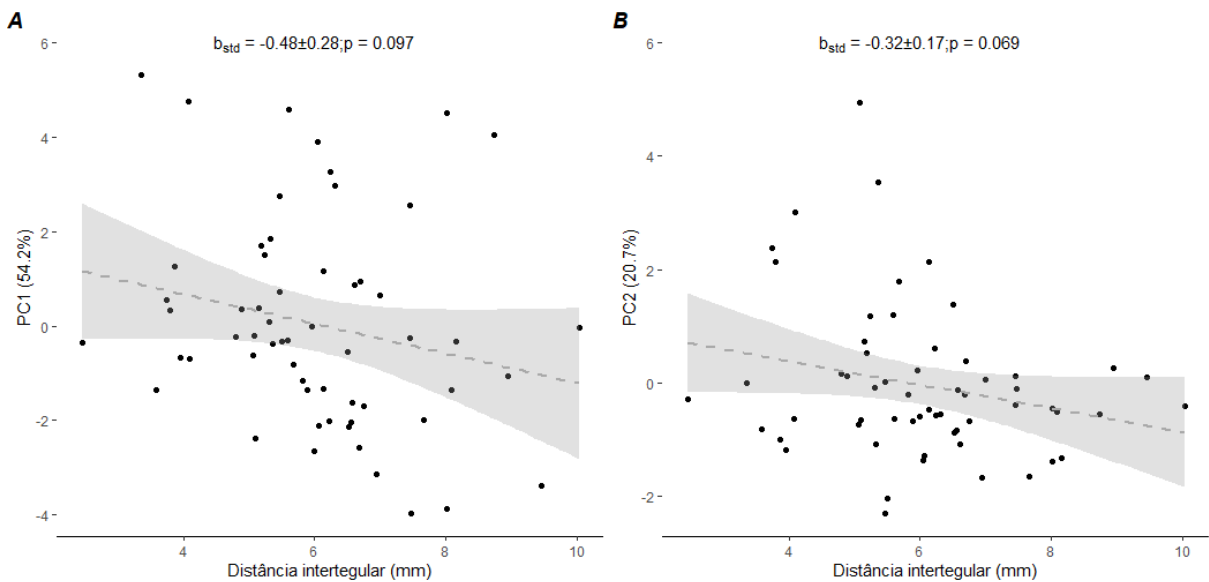
APÊNDICE S9. Teste de randomização dos autovalores do PCA para detectar quais componentes principais recuperam informação biológica relevante das variáveis originais descrevendo o comportamento das abelhas *Bombus morio*. Os pontos vermelhos correspondem aos autovalores observados extraídos do PCA e os boxplots referem-se aos autovalores randomizados (distribuição nula de autovalores). Os dois primeiros eixos principais do PCA (PC1 e PC2) são biologicamente relevantes neste caso ($p < 0.001$).



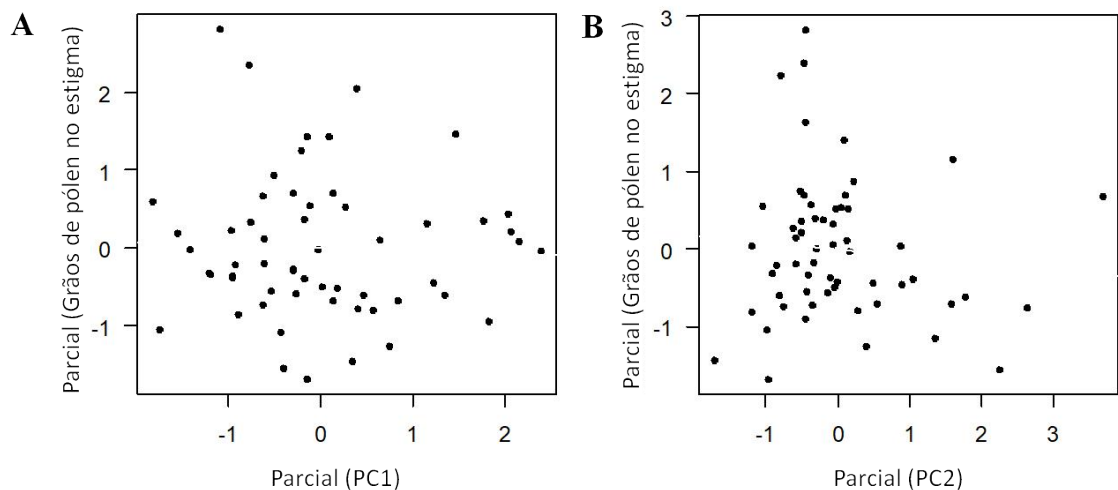
APÊNDICE S10. Teste de randomização das cargas (*loadings*) que contribuem com os dois primeiros eixos principais do PCA (PC1 e PC2). Os pontos em vermelho correspondem as cargas observadas extraídos do PCA para cada componente principal. Os boxplots referem-se as cargas randomizados (distribuição nula de cargas). A) Teste de randomização realizado com as cargas associadas ao PC1, em que as cargas observadas de tempo de manipulação, tempo de vibração, tempo de limpeza, número de pulsos, deslocamento máximo e deslocamento somado foram relevantes biologicamente ($p < 0.001$). B) Teste de randomização realizada com as cargas associadas ao PC2, em que as cargas observadas de amplitude e deslocamento angular médio foram relevantes biologicamente ($p < 0.001$).



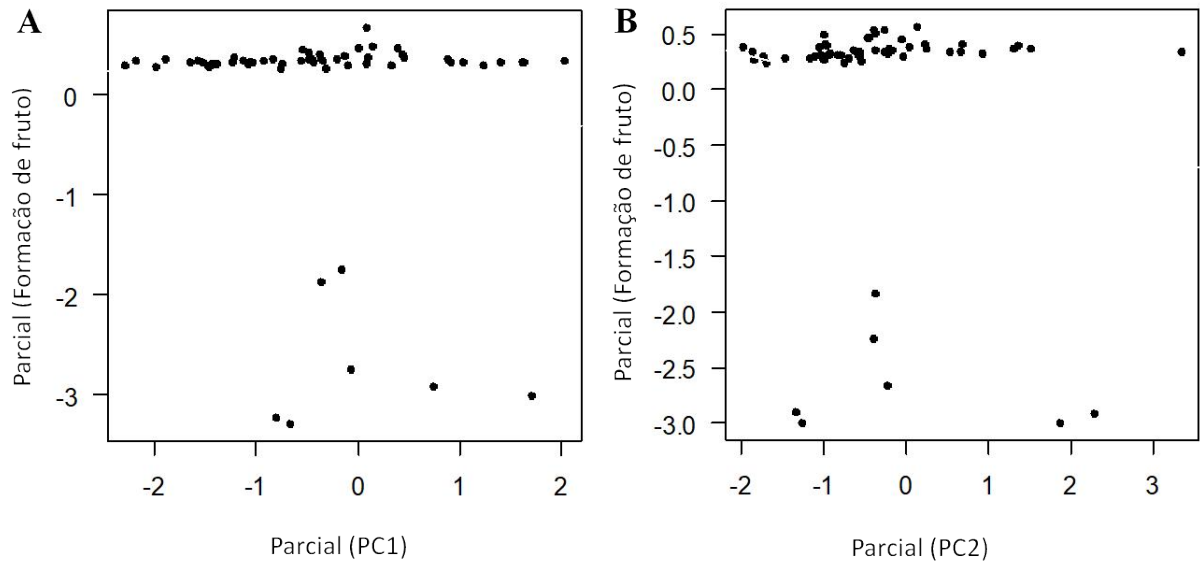
APÊNDICE S11. Relação entre a distância intertegular e os dois primeiros componentes principais da PCA. A) Relação entre a distância intertegular, em milímetros, e o PC1 ($F = 2.8$; n amostral = 59 flores; $p = 0.097$). B) Relação entre a distância intertegular, em milímetros, e o PC2 ($F = 3.4$; n amostral = 59 flores; $p = 0.069$). A linha de tendência tracejada representa valores de p acima de 0.05 e a linha contínua, valores de p abaixo de 0.05. O sombreado cinza representa o intervalo de confiança em torno da linha de tendência. b_{std} = coeficiente de estimativa padronizado $\pm$ erro padronizado.



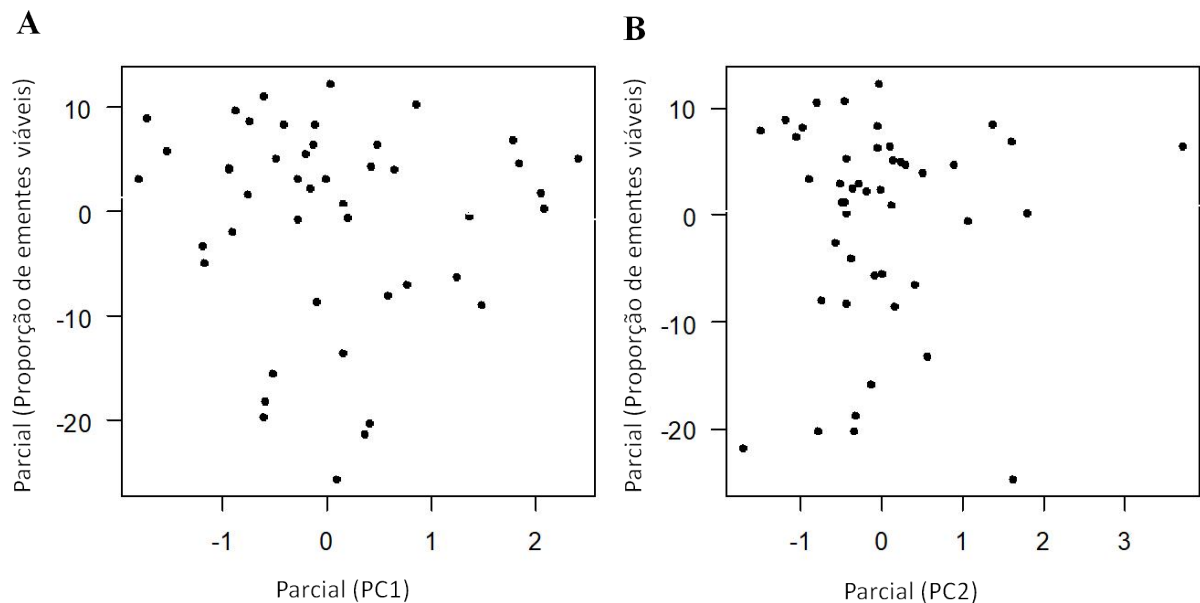
APÊNDICE S12. Relação entre os grãos de pólen do estigma e o comportamento das abelhas representado pelo PC1 e PC2. A) Relação entre os grãos de pólen no estigma e o PC1; B) Relação entre os grãos de pólen no estigma e o PC2.



APÊNDICE S13. Relação entre a formação de frutos e o comportamento das abelhas representado pelo PC1 e PC2. A) Relação entre a formação de frutos e o PC1; B) Relação entre a formação de frutos e PC2.

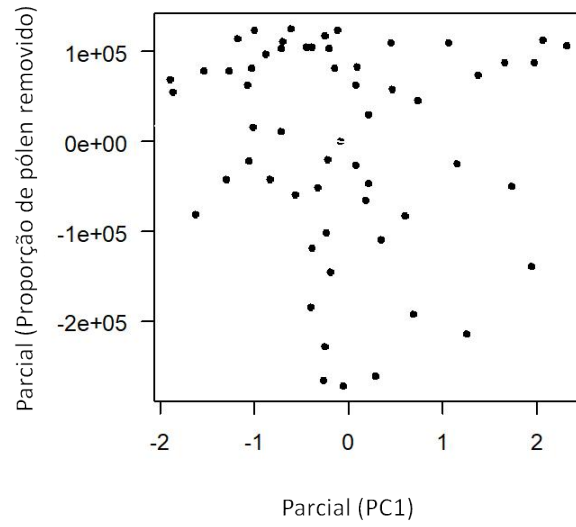


APÊNDICE S14. Relação entre a proporção de semente viáveis e o comportamento das abelhas representado pelo PC1 e PC2. A) Relação entre a proporção de sementes viáveis e o PC1; B) Relação entre a proporção de sementes viáveis e PC2.



APÊNDICE S15. Relação entre a proporção de grãos de pólen removidos das anteras e o comportamento das abelhas representado pelo PC1 e PC2. A) Relação entre a proporção de

grãos de pólen removidos das anteras e o PC1; B) Relação entre a proporção de grãos de pólen removidos das anteras e PC2.

A**B**