UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

Morfometria das antenas das abelhas crepusculares e/ou noturnas (Hymenoptera:
Apoidea) e um novo enfoque metodológico para conhecer sua diversidade

Carlos Augusto Martínez Martínez

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo, como
parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Ciências, obtido no
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia.

Ribeirão Preto - SP

(2021)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

Morfometria das antenas das abelhas crepusculares e/ou noturnas (Hymenoptera:
Apoidea) e um novo enfoque metodológico para conhecer sua diversidade

Carlos Augusto Martínez Martínez

Dissertação—apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

Orientadora: Dra. Isabel Alves Dos Santos

Ribeirão Preto - SP

(2021)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Isabel Alves dos Santos, pela compreensão, ajuda, dedicação, oportunidade e nunca desistir mesmo nesses momentos de pandemia.

À minha família por seu apoio.

Aos meus amigos Margarita Dussan Arquez e Leiner Benavides, que desde longe me incentivaram para chegar até aqui.

Aos meus amigos Jessica Pissolato, João Sino, Karen Ishimine por me fazerem sentir em casa.

Aos meus amigos da minha república CACTUS, em especial Vitor Yamada, Diego Yamada e Marcel Tiba por me ajudarem durante os dois anos de mestrado e por me fazerem sentir em casa.

Aos meus irmãos brasileiros Renan Kobal de Oliveira Cardoso e Herbeson Ovidio Martins por me ensinarem muitas coisas e por serem tão maravilhosos comigo.

Aos meus companheiros e amigos do programa de Entomologia, em especial Felipe Freitas, Fabiano Stefanello e Danilo Ament, pela ajuda durante o primeiro ano de mestrado.

Ao professor Eduardo Almeida, pela ajuda e compreensão durante os dois anos de mestrado.

Aos professores Sidnei Mateus e Tiago Franco por suas avaliações e recomendações.

À secretaria do Programa de Pós-graduação em Entomologia Renata Aparecida de Andrade Cavallari, pelo constante apoio e empenho com todos estudantes do Programa.

Ao Laboratório de Abelhas do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em especial aos colegas Sheina Koffler e Sergio Hilário.

Ao Laboratório de Biologia Comparada e Abelhas (LBCA), pelo espaço de trabalho e por permitir o uso do equipamento para medir e identificar meu material de trabalho.

Ao Prof. Marcelo Pompeo do Departamento de Ecologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo por permitir o uso do equipamento de microscopia.

Ao Laboratório de Ecologia e Evolução de Abelhas e Vespas, em especial ao professor Carlos Garófalo e Patrícia Vilhena por permitir o uso do laboratório.

Ao senhor Antônio Rogerio dos Santos pela permissão para coletar abelhas noturnas em sua própria residência, na região de Osasco, SP.

Aos parques e reservas ambientais Parque Municipal Serra do Japi, Parque das Neblinas da Ecofuturo e Parque Estadual Campos do Jordão pela hospedagem, por permitir o acesso e a realização das coletas das abelhas noturnas.

A CAPES pela bolsa de Mestrados e Auxílios.

Ao Programa de PG em Entomologia pelo suporte durante os dois anos de Mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram com essa maravilhosa experiência.

Muito obrigado!

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Martínez-Martínez, Carlos Augusto

Morfometria das antenas das abelhas crepusculares e/ou noturnas (Hymenoptera: Apoidea) e um novo enfoque metodológico para conhecer sua diversidade. Ribeirão Preto, 2021. 93 f.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Entomologia.

Orientador: Dr. Isabel Alves Dos Santos.

1. Sistema olfativo. 2. Segmentos antenais. 3. *Megalopta*. 4. *Ptiloglossa*. 5. 2-phenylethanol.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
INTRODUÇÃO GERAL. As abelhas crepusculares e noturnas e o sistema olfativo: aspetos gerais e históricos	14
Abelhas crepusculares e noturnas: características, sistemática e comportamento	15
Sistema olfativo	23
OBJETIVOS	26
Objetivo Geral.....	26
Objetivos Específicos	26
REFERÊNCIAS	27
CAPITULO 01. Comparação morfométrica e alométrica dos segmentos antenais entre abelhas noturnas e diurnas	31
INTRODUÇÃO	32
METODOLOGIA.....	34
Área de estudo	34
Amostragem de abelhas.....	35
Morfometria e Alometria.....	41
Análises de dados.....	42
RESULTADOS	43
Morfometria do comprimento das antenas	43
Morfometria do diâmetro dos flagelômeros	48
Morfometria da área dos flagelômeros.....	52
Similaridade na morfologia das antenas	56
Alometria	58
DISCUSSÃO.....	61
REFERÊNCIA	64
CAPITULO 02. Floral volatiles: a promising method to access the rare nocturnal and crepuscular bees.....	69
ABSTRACT	70
INTRODUCTION	71
MATERIAL AND METHODS.....	72
Nocturnal bee sampling.....	72
Literature review	73

RESULTS	74
DISCUSSION.....	78
ACKNOWLEDGMENTS	80
AUTHOR CONTRIBUTIONS, CONFLICT OF INTEREST, FUNDING	81
REFERENCES	81
APÊNDICE A – Informação detalhada de coleta das abelhas diurnas e noturnas	90
APÊNDICE B – Informação detalhada das abelhas diurna e noturnas de coleções biológicas ..	91
APÊNDICE C – Diferenças estatísticas entre as abelhas noturnas e diurnas baseadas nas medidas analisadas.....	92

RESUMO

As abelhas crepusculares e/ou noturnas raramente são coletadas, pois forrageiam antes de nascer e depois do pôr do sol ou durante a noite. Esse grupo caracteriza-se por possuir grandes ocelos e olhos compostos de aposição modificados para se orientar em ambientes com condições de pouca luminosidade. Os estudos morfométricos realizados neste grupo de abelhas dão enfoque no sistema ótico, analisando principalmente a forma, o comprimento e a área dos olhos, omatídeos, ocelos, e rabdômeros. No sistema olfativo, alguns estudos foram feitos na identificação de voláteis florais associados ao processo de forrageamento destas abelhas. Em contra partida, as análises morfométricas do sistema olfativo são escassas e estão restritas ao registro de sensilas em duas espécies noturnas e a medidas de alguns segmentos das antenas para descrições taxonômicas. Este estudo propôs comparar a variação morfométrica de comprimento, diâmetro e área dos segmentos antenais entre abelhas noturnas e diurnas e avaliar a existência de uma correlação entre o tamanho dos segmentos antenais e a distância intertegular nas abelhas noturnas. Para isso foram examinadas abelhas de seis espécies noturnas e quatro espécies diurnas provenientes de diferentes localidades. As espécies noturnas analisadas foram *Megalopta aegis*, *Megalopta amoena*, *Megommation insigne*, *Ptiloglossa latecalcarata*, *Zikanapis seabrai* e *Zikanapis zikani*. Já as espécies diurnas foram *Augochloropsis cognata*, *Bombus brasiliensis*, *Centris nitens* e *Apis mellifera*. As abelhas noturnas foram atraídas e coletadas com voláteis florais. As abelhas diurnas foram capturadas em flores (abelha do mel) ou obtidas em coleções entomológicas. No total foram analisadas 127 abelhas, 60 diurnas e 67 noturnas. Os resultados das análises morfométricas mostraram que as abelhas noturnas de porte médio dos gêneros *Megalopta* e *Megommation* e a abelha de grande porte *P. latecalcarata* apresentam valores médios significativamente maiores de comprimento, diâmetro e área na maioria dos segmentos, em especial dos segmentos $F_5 - F_{10}$, quando comparado com as espécies diurnas *A. cognata*, *B. brasiliensis* e *C. nitens*. Por outro lado, o tamanho dos segmentos antenais não apresenta correlação com a distância intertegular em pelo menos três espécies de abelhas noturnas. Em abelhas noturnas que usam pistas olfativas para encontrar fontes de alimentos, um maior tamanho dos segmentos possivelmente está relacionado com a disponibilidade de área para os órgãos sensoriais (sensilas) capazes de detectar estímulos químicos, assim como acontece nas antenas de machos de mariposas e de abelhas sociais, onde um maior tamanho e número de sensilas quimiorreceptoras permite detectar fêmeas. No capítulo 2 desta dissertação apresentamos um estudo que propõe a utilização de compostos químicos, imitando os voláteis florais de plantas com antese noturna, na atração e captura das abelhas noturnas. Os dados apresentados provêm de uma revisão bibliográfica e de coletas recentes. Representantes de 14 espécies de abelhas noturnas foram capturados, sendo *Megalopta* o gênero mais numeroso (nove espécies). Estas abelhas foram atraídas por ao menos 10 compostos químicos identificados dos buquês florais ou mistura dos mesmos. O composto 2-phenylethanol foi o mais atrativo. Este método de amostragem pode ser incorporado aos levantamentos de apifauna para aumentar o conhecimento sobre a diversidade de abelhas noturnas.

Palavras Chaves: Sistema olfativo, segmentos antenais, *Megalopta*, *Ptiloglossa*, alometria, compostos orgânicos voláteis, 2-phenylethanol.

ABSTRACT

Nocturnal and/or crepuscular bees are rarely collected, as they forage before sunset and after sunrise or during the night. This group is characterized by having large eyes and compound apposition eyes modified to orient themselves in environments with low light conditions. The morphometric studies carried out in this group of bees are focused on the optical system, mainly analyzing the shape, length, and area of the eyes, ommatids, ocelli, and rhabdomere. In the olfactory system, some studies have been done in the identification of floral volatiles associated with the foraging process of these bees. Therefore, morphometric analysis of the olfactory system is scarce, and they are restricted to the recording of sensilla in two nocturnal species and to the measurements of some segments of the antennae for taxonomic descriptions. This study proposed to compare the morphometric variation in length, diameter and area of the antenna segments between nocturnal and diurnal bees and to assess the existence of a correlation between the size of the antenna segments and the intertegular distance in the nocturnal bees. For this, bees from six nocturnal species and four diurnal species from different locations were examined. The nocturnal species analyzed were *Megalopta aegis*, *Megalopta amoena*, *Megommation insigne*, *Ptiloglossa latecalcarata*, *Zikanapis seabrai* and *Zikanapis zikani*. The diurnal species were *Apis mellifera*, *Augochloropsis cognata*, *Bombus brasiliensis*, *Centris nitens* and *Apis mellifera*. The nocturnal bees were attracted and collected with volatile flowers. Diurnal bees were collected from flowers (honey bee) or obtained from entomological collections. A total of 127 bees were analyzed, 60 diurnal and 67 nocturnal. The results of the morphometric analysis showed that the medium-sized nocturnal bees of the genera *Megalopta* and *Megommation* and the large bee *P. latecalcarata* present significantly higher mean values of length, diameter and area in most segments; especially of the F₅ - F₁₀ segments, when compared with the diurnal species *A. cognata*, *B. brasiliensis* and *C. nitens*. However, the size of the antenna segments does not correlate with the intertegular distance in at least three species of nocturnal bees. In nocturnal bees that use olfactory cues to find the food sources a larger size of the segments is possibly related to the availability of area for sensory organs (sensillas), able to detect chemical stimulus, as it happens in the antennae of male moths and social bees, where a larger size and number of chemoreceptors sensilla make it easier to detect females. In chapter 2 of this dissertation, we present a study that proposes the use of chemical compounds, resembling the volatile floral of plants with nocturnal anthesis, in the capture and sampling of nocturnal bees. The data presented come from a bibliographic review and recent collections. A total of 14 species of nocturnal bees were captured, with *Megalopta* being the most diverse genus (nine species). These bees were attracted to at least 10 chemical compounds identified from the floral bouquets or a mixture of them. 2-phenylethanol compound was the most attractive. This sampling method can be incorporated in apifauna surveys to increase knowledge about the diversity of nocturnal bees.

Keywords: Olfactory system, antennal segments, *Megalopta*, *Ptiloglossa*, allometry, volatile organic compounds, 2-phenylethanol.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL. As abelhas crepusculares e noturnas e o sistema olfativo: aspectos gerais e históricos

Figura 1. Janela de atividade de forrageamento das abelhas crepusculares e noturnas. A posição do sol com relação ao horizonte é indicada em graus. 16

Figura 2. Cladograma das famílias de abelhas modificado a partir de Danforth *et al.* (2013) mostrando a origem independente do comportamento noturno. 17

Figura 3. Comparação morfológica dos olhos e ocelos entre abelhas noturna (acima) e diurna (abaixo). **A**= cabeça da abelha noturna *Megalopta aeneicollis*; **B**= cabeça da abelha diurna *Augochloropsis metallica*. 20

Figura 4. Descrição geral da morfologia externa da antena de *Apis mellifera*. 24

CAPITULO 01. Comparação morfométrica e alométrica dos segmentos antenais entre abelhas noturnas e diurnas

Figura 1. Coleta de abelhas crepusculares e/ou noturnas. A= Coletor de prontidão na isca atrativa, B= *Megommation insigne* atraída na isca de papel filtro com o composto 2-phenylethanol. 38

Figura 2. Abelhas diurnas usadas para a comparação morfométrica A= *Apis mellifera*, B= *Augochloropsis cognata*, C= *Bombus brasiliensis*, D= *Centris nitens*. 39

Figura 3. Abelhas crepusculares e/ou noturnas usadas para a comparação morfométrica. A= *Megalopta amoena*, B= *Megalopta aegis*, C= *Megommation insigne*, D= *Ptiloglossa latecalcarata*, E= *Zikanapis seabrai*, F= *Zikanapis zikani*. 40

Figura 4. Medidas aplicadas a cada um dos segmentos das antenas direitas das abelhas coletadas. A= Comprimento, B= Diâmetro, C= Distância intertegular. O número de decimais usados foi três e a unidade de medida (mm). 41

Figura 5. Modelos geométricos para calcular áreas dos segmentos antenais de acordo com Fonta e Masson (1982). A= modelo para calcular áreas dos segmentos F₂ a F₉, B= modelo para calcular área do segmento F₁₀. 42

Figura 6. Diferenças morfométricas do comprimento entre a abelha diurna *Augochloropsis cognata* e as abelhas noturnas *Megalopta aegis*, *Megalopta amoena* e *Megommation insigne*. Todas as medidas estão em (mm). O n amostral de todas as espécies é 15. Com exceção de F₁₀ em *Megalopta amoena* todos os valores apresentaram diferenças significativas (P ≥ 0,05). ... 46

Figura 7. Diferenças morfométricas do comprimento entre as abelhas diurnas *Bombus brasiliensis* e *Centris nitens* e as abelhas noturnas *Ptiloglossa latecalcarata*, *Zikanapis seabrai* e *Zikanapis zikani*. Todas as medidas estão em (mm). O n amostral de todas as espécies é 15, com exceção de *Zikanapis*: *Z. seabrai* (4) e *Z. zikani* (3). *= Diferenças estatísticas significativas (P ≥ 0,05) 47

Figura 8. Diferenças morfométricas do diâmetro dos flagelômeros nas antenas da abelha diurna *Augochloropsis cognata* e das abelhas noturnas *Megalopta aegis*, *Megalopta amoena* e *Megommation insigne*. Todas as medidas estão em (mm). O n amostral de todas as espécies é 15. Todos os valores apresentaram diferenças significativas ($P \geq 0,05$).....50

Figura 9. Diferenças morfométricas do diâmetro dos flagelômeros nas antenas das abelhas diurnas *Bombus brasiliensis* e *Centris nitens* e das abelhas noturnas *Ptiloglossa latecalcarata*, *Zikanapis seabrai* e *Z. zikani*. Todas as medidas estão em (mm).). O n amostral de todas as espécies é 15, com exceção de *Z. seabrai* (4) e *Z. zikani* (3). *= Diferenças estatísticas significativas ($P \geq 0,05$).51

Figura 10. Diferenças morfométricas da área dos flagelômeros nas antenas da abelha diurna *Augochloropsis cognata* e das abelha noturnas *Megalopta aegis*, *Megalopta amoena* e *Megommation insigne*. Todas as medidas estão em (mm). O n amostral de todas as espécies é 15. Todos os valores apresentaram diferenças significativas ($P \geq 0,05$).....54

Figura 11. Diferenças morfométricas da área dos flagelômeros nas abelhas diurnas *Bombus brasiliensis* e *Centris nitens* e abelha noturnas *Ptiloglossa latecalcarata*, *Zikanapis seabrai* e *Zikanapis zikani*. Todas as medidas estão em (mm). O n amostral de todas as espécies é 15, com exceção de *Zikanapis*: *Z. seabrai* (4) e *Z. zikani* (3).55

Figura 12. Similaridade na morfologia da antena das espécies noturnas e diurnas examinadas com base na distância Euclidiana. **A**= Comprimento dos segmentos, **B**= Diâmetro e **C**= Área dos flagelômeros. Os números dentro dos dendogramas indicam a porcentagem de suporte dos clados de acordo com análise Bootstrap57

Figura 13. Regressão e correlação entre os segmentos antenais da abelha noturna *Megalopta aegis* e a distância intertegular. O **R2adj** representa a porcentagem de explicação de variável independente. **Pearson** representa o índice de correlação. *= alta correlação. **Sombreado**= Erro padrão.....59

CAPITULO 02. Floral volatiles: a promising method to access the rare nocturnal and crepuscular bees

Figure 1. Percentage of individuals per bee species attracted previously by volatile organic substances of various classes of chemical compounds (see also Table 1 and 2). The total number of individuals collected from each species is given in parentheses75

Supplementary Figure 1. Diagram of the active (**A**) and passive (**B**) method used to collect crepuscular and nocturnal bees with chemical compounds. We recommend the application of about 1 ml chemical compounds to filter paper or a cotton ball, which will be disposal directly on the plant branch or inside the trap bottle87

Supplementary Figure 2. Electro-antennographic responses of *Megommation insigne* (n= 2); **A**= Individual 1, **B**= Individual 2; **T** The top line shows the moment the 0.7 s stimulus was applied by the stimulus controller (flat top peaks) and the simultaneous electro-antennographic recording below (EAD, 0.5 mV). **a**= Acetone (control), **c**= Synthetic scent mixture of *Campomanesia phaea* floral bouquet (1-hexanol, 1-octanol, benzyl alcohol, 2-phenylethanol, 10-1 dilution in acetone, 10 µL), **p**= 2-phenylethanol (10-3 dilution in acetone, 10 µL).89

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 01. Comparação morfométrica e alométrica dos segmentos antenais entre abelhas noturnas e diurnas

Tabela 1. Média da distância intertegular das abelhas diurnas e noturnas examinadas.37

Tabela 2. Média e desvio padrão do comprimento de cada segmento das antenas nas espécies de abelhas diurnas e noturnas examinadas. Abelhas de médio porte, abelhas de grande porte e *Apis mellifera*. Valores em mm. Foram examinados 15 indivíduos de cada espécie, com exceção de *Zikanapis*: *Z. seabrai* (4) e *Z. zikani* (3). Em negrito os valores superiores à espécie de referência.45

Tabela 3. Média e desvio padrão do diâmetro dos flagelômeros nas antenas nas espécies de abelhas diurnas e noturnas examinadas. Valores em mm. Foram examinados 15 indivíduos de cada espécie, com exceção de *Zikanapis*: *Z. seabrai* (4) e *Z. zikani* (3). Em negrito os valores superiores à espécie de referência.49

Tabela 4. Média e desvio padrão da área dos flagelômeros nas antenas de cada segmento das espécies de abelhas diurnas e noturnas examinadas. Valores em mm. Foram examinados 15 indivíduos de cada espécie, com exceção de *Zikanapis*: *Z. seabrai* (4) e *Z. zikani* (3). Em negrito os valores superiores à espécie de referência53

Tabela 5. Coeficientes estimados da regressão linear entre os segmentos antenais das abelhas noturnas e a distância intertegular. Em negrito os valores com diferença significativa ($P \leq 0,05$).60

Tabela 6. Coeficiente de correlação de Pearson entre s segmentos antenais das abelhas noturnas e a distância intertegular. Em negrito os segmentos com alta correlação..60

APÊNDICE A – Informação detalhada de coleta das abelhas diurnas e noturnas

Tabela S1. Dados de coleta das abelhas diurnas e noturnas. Todas as abelhas coletadas são fêmeas.90

APÊNDICE B – Informação detalhada das abelhas diurna e noturnas de coleções biológicas

Tabela S2. Dados de coleta de abelhas diurnas e noturnas da coleção biológica CEPANN e da coleção Prof. J.M.F. Camargo. Mix 1= benzyl alcohol, 2-phenylethanol, hexanol, 1-hexanol, (Z)-3-hexen-1-ol, e 1-octanol. CEPANN= *Megommation insigne*, *Zikanapis seabrai*, *Augochloropsis cognata*, *Centris nitens*, *Bombus brasiliensis*. Prof. J.M.F. Camargo= *Megalopta amoena*, *Megalopta aegis*91

APÊNDICE C – Diferenças estatísticas entre as abelhas noturnas e diurnas baseadas nas medidas analisadas

Tabela S3. P-valores das comparações do comprimento de cada segmento da antena entre as abelhas noturnas e sua correspondente diurna. **a**= Diferença estatística significativa ($P \leq 0,01$), **b**= Diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$).....92

Tabela S4. P-valores das comparações do diâmetro do flagelo entre as abelhas noturnas e sua correspondente diurna. **a**= Diferença estatística significativa ($P \leq 0,01$), **b**= Diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$).....93

Tabela S5. P-valores das comparações da área do flagelo entre as abelhas noturnas e sua correspondente diurna. **a**= Diferença estatística significativa ($P \leq 0,01$), **b**= Diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$).....94

CAPITULO 02. Floral volatiles: a promising method to access the rare nocturnal and crepuscular bees

Table 1. Records of crepuscular and nocturnal bee species lured with volatile organic compounds and collected with active method. All the specimens collected are female, except *Ptiloglossa pretiossa*.....76

Table 2. Records of crepuscular and nocturnal bee species lured with volatile organic compounds and collected with passive method. All the specimens collected are female.77

Supplementary Table 1. Location of the areas where the nocturnal bees were sampled in Brazil using chemical compounds. The number in parenthesis on the locality assigns to the reference. References: 1= Cordeiro et al. (2017); 2= Krug et al. (2018); 3= Almeida et al. (2020); 4= Carvalho et al. (2012); 5= Knoll and Santos (2012).86

INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas crepusculares e noturnas e o sistema olfativo: aspetos gerais e históricos

Abelhas crepusculares e noturnas: características, sistemática e comportamento

As abelhas são um importante grupo de vespas que se alimentam de pólen e néctar e fazem parte do clado Antophila na superfamília Apoidea (ENGEL; RASMUSSEN; GONZALEZ, 2020). As abelhas são um componente importante nos ecossistemas terrestres já que são as principais polinizadoras das plantas com flores ou angiospermas (DANFORTH, 2007). O aparecimento desse grupo remonta ao início do Cretáceo há 123 milhões de anos, junto com as eudicotiledôneas (MICHENER, 2000). Porém estima-se que a maioria dos clados das abelhas se originou no Cretáceo médio e superior junto com a diversificação das angiospermas (CARDINAL; DANFORTH, 2013). Possivelmente as abelhas facilitaram a diversificação das angiospermas visto o importante papel que desempenham na reprodução das plantas com flores (DANFORTH, 2007).

Atualmente, existem 20.400 espécies de abelhas descritas que podem variar drasticamente em forma e tamanho (ENGEL; RASMUSSEN; GONZALEZ, 2020). A maioria das espécies é de vida solitária, mas também existem as espécies comunais, subsociais e eusociais (MICHENER, 2000). O comportamento eusocial é um dos mais complexos encontrados entre os insetos, no qual ocorre sobreposição de gerações, cuidado parental e divisão de casta reprodutiva (KOCHER; PAXTON, 2014).

As abelhas apresentam hábitos de forrageamento que incluem coleta de alimento e de materiais para a construção dos ninhos (MALERBO-SOUZA; SILVA, 2011). A atividade de forrageamento das abelhas em sua maioria é diurna, ou seja, buscam o pólen e néctar durante o dia. No entanto, existem abelhas crepusculares e/ou noturnas que forrageiam antes e depois do pôr do sol (WARRANT, 2007). Sob condições ideais de luz da lua e da cobertura das nuvens, o período crepuscular se estende permitindo a busca de recursos à noite toda (Figura 1) (KERFOOT, 1967; WARRANT, 2007). Um exemplo disso é a abelha da família Halictidae, *Sphecodogastra texana*, atualmente conhecida como *Lasioglossum texanum* (MCGINLEY, 2003), que sincroniza sua atividade de forrageamento com o ciclo lunar de aproximadamente 29 dias (KERFOOT, 1967). Essa relação entre o comportamento noturno e a lua também foi registrada em vespas sociais do gênero *Apoica* onde a frequência de forrageamento aumentou em noites de lua cheia e crescente (NASCIMENTO; TANNURE-NASCIMENTO, 2005).

Por outro lado, também existem abelhas obrigatoriamente noturnas, que estão ativas durante as noites mais escuras, como a abelha *Xylocopa tranquebarica*, mas aumentam o número de vôos quando há lua cheia (Figura 1) (BURGETT; SUKUMALANAND, 2000).

Figura 1. Janela de atividade de forrageamento das abelhas crepusculares e noturnas. A posição do sol com relação ao horizonte é indicada em graus.

O comportamento noturno e crepuscular surgiu independentemente em quatro das sete famílias de abelhas atuais: Andrenidae, Apidae, Colletidae e Halictidae (Figura 2) (WARRANT, 2008; DANFORTH et al., 2019). Enquanto em outros himenópteros, como as vespas, esse comportamento está restrito a família Mutillidae e a dois gêneros da família Vespidae, *Apoica* com nove espécies e o gênero do sudeste asiático *Provespa* com três espécies (WARRANT, 2008). No caso de Andrenidae, foram registradas 26 espécies do gênero *Andrena*, duas no subgênero *Diandrena* e 24 em *Onagrاندrena*, como abelhas matutinas e crepusculares, e seis espécies de *Perdita* do subgênero *Xerophasma* (DANFORTH et al., 2019). Na família Halictidae, na qual se encontra a maior diversidade de abelhas noturnas e crepusculares (WCISLO; TIERNEY, 2009) há representantes no gênero *Lasioglossum* (Halictini) com nove espécies (oito no

subgênero *Sphécodogastra* e a espécie *Hemihalictus lustrans*). Na tribo Augochlorini temos representantes de 4 gêneros com hábitos noturnos/crepusculares: *Megalopta* (com 30 espécies), *Noctoraptor* (que são cleptoparasitas de *Megalopta*), *Megaloptidia* (com três espécies) e *Megommation* (gênero mono específico representado por *Megommation insigne*) (WCISLO et al., 2004; DANFORTH et al., 2019). Na família Colletidae os representantes noturnos estão concentrados na subfamília Diphaglossinae, nos gêneros: *Caupolicana*, *Zikanapis* e *Ptiloglossa*, considerados por Urban, Moure e Melo (2012) como parte da subtribo Caupolicanina. Porém Danforth et al. (2019) também registram uma espécie de Colletinae (*Colletes stepheni*) como espécie crepuscular. Finalmente, na família Apidae, o gênero *Xylocopa* possui quatro espécies crepusculares (três no subgênero *Nyctomelitta* e a espécie *X. tabaniformis*), no gênero *Apis* duas espécies são relatadas como crepusculares (*Apis dorsata* e *A. mellifera adansonii*), na tribo Eucerini uma espécie (*Eucera speciosa*) e na tribo Nomadini a espécie *Odyneropsis apicalis* (cleptoparasita de *Ptiloglossa*) (WARRANT, 2007; DANFORTH et al., 2019).

Figura 2. Cladograma das famílias de abelhas modificado a partir de Danforth *et al.* (2013) mostrando a origem independente do comportamento noturno.

As mudanças evolutivas do comportamento diurno para o noturno ocorreram independentemente (Figura 2), abrindo um novo nicho para as abelhas, onde surgiram especializações em características anatômicas (WCISLO et al., 2004). As principais características morfológicas que diferenciam as abelhas diurnas das noturnas são o tamanho grande dos ocelos e dos olhos compostos, além de um maior diâmetro e número de omatídios (Figura 3) (WARRANT, 2007). Os ocelos são encontrados na superfície dorsal da cabeça entre os olhos e acredita-se que suas funções incluam navegação, orientação e estabilização do vôo. Diferente dos olhos compostos, os ocelos estão acoplados a neurônios grandes com pouca sinapse, enviando sinais rápidos para os músculos torácicos, porém não há clareza sobre o papel que desempenham nas abelhas noturnas (WARRANT et al., 2006). Estudos realizados com o gênero *Megalopta* sugerem uma correlação entre o tamanho do ocelo e o horário de atividade de forrageamento (WARRANT et al., 2006; BERRY; WCISLO; WARRANT, 2011). Além disso, a posição dos ocelos laterais, permiti a visualização do campo visual dorsal, enquanto o ocelo central recebe informações dorso-frontal. Portanto, eles também estão associados à detecção de alterações nos níveis de luz (WARRANT et al., 2006). Diferente de outros himenópteros noturnos, como os do gênero *Apoica*, os ocelos de *Megalopta* têm rabdômeros maiores (WARRANT et al., 2006). Isso permite capturar maior quantidade de luz e indica a possibilidade dos ocelos fazerem parte de um sofisticado sistema de navegação que ajuda na atividade de forrageamento e na separação do horizonte. Em segundo lugar, os olhos compostos das abelhas crepusculares e noturnas são de aposição (como em todas outras abelhas) (Figura 3), o que significa que eles operam em intensidades de luz intensa, restringindo o animal a um estilo de vida diurno. Em olhos de superposição, típicos de insetos noturnos, como besouros e mariposas, há uma maior captura de fótons (GREINER, 2006).

Para compensar a baixa sensibilidade dos olhos de aposição às abelhas noturnas e/ou crepusculares possuem um maior diâmetro nas facetas dos omatídios e rabdômeros. De acordo com Greiner et al. (2004) ao comparar os olhos compostos de *Megalopta genalis* com os do modelo clássico de *Apis mellifera*, observa-se que o tamanho das facetas nos omatídios é 1,8 vezes maior e no rabdoma 4-5 vezes mais largo. Em *Apis dorsata*, os diâmetros maiores das facetas e um melhor ângulo de recepção da luz por parte dos omatídios permitem que seus olhos sejam duas vezes mais sensíveis do que *A. mellifera* (SOMANATHAN et al., 2009a). No entanto, a

sensibilidade de *A. dorsata* é 10 vezes menor que a dos especialistas crepusculares e noturnos *Megalopta genalis* e *Xylocopa tranquebarica*, deixando uma incógnita de como essas abelhas conseguem voar nas noites iluminadas apenas pela lua. Da mesma forma, *X. tranquebarica* possui facetas grandes e rabdômeros amplos, dando-lhe uma sensibilidade nove vezes maior que a de seu parente crepuscular *Xylocopa tenuiscapa* e 27 vezes maior em relação a espécie diurno *Xylocopa leucothorax* (SOMANATHAN *et al.*, 2009b). Além disso, presume-se que *X. tranquebarica* tenha estratégias visuais adicionais, incluindo fotorreceptores com maior tempo de integração para obter maior contraste e um mecanismo de soma neural que aumenta a acurácia visual (SOMANATHAN *et al.*, 2009b).

Sem dúvida, esse conjunto de adaptações específicas dos olhos compostos de aposição investigados por anos mostra que essas estratégias melhoraram a acurácia visual para a navegação e orientação nas abelhas (WARRANT, 2008). Assim como os insetos diurnos usam cenários e objetos para se orientar, muitos insetos noturnos, incluindo as abelhas, usam pontos de referência para forragear ou localizar com precisão as entradas de seus ninhos (WARRANT; DACHE, 2011). Somanathan *et al.* (2008) mostram evidências de que a abelha gigante indiana obrigatoriamente noturna *X. tranquebarica* usa a visão de cores para discriminar pontos de referência.

Figura 3. Comparação morfológica dos olhos e ocelos entre abelhas noturna (acima) e diurna (abaixo). **A**= cabeça da abelha noturna *Megalopta aeneicollis*; **B**= cabeça da abelha diurna *Augochloropsis metallica*.

Apesar de serem conhecidas estas adaptações morfológicas específicas da óptica que favorece a orientação e a navegação das abelhas crepusculares e noturnas, que fatores realmente possibilitaram a transição evolutiva do nicho diurno para um noturno? Duas hipóteses ecológicas que tentam explicar o hábito noturno nos morcegos, também se aplicam nas abelhas noturnas (WCISLO et al., 2004). Uma delas é de reduzir a competição por recursos e a outra evitar predadores e parasitas.

Abelhas crepusculares e noturnas visitam plantas com anteses diurna e noturna e aquelas com antese obrigatoriamente noturna. Esta estratégia permite o uso abundante de recursos inexplorados de néctar e pólen a noite e nos crepúsculos quando a maioria das abelhas diurnas não estão ativas e os potenciais concorrentes são reduzidos a morcegos e mariposas (WCISLO et al., 2004). Este comportamento sugere que a ordem de chegada é importante, uma vez que o recurso floral se torna escasso à medida que os visitantes comparecem (WCISLO et al., 2004; WARRANT, 2007). Para confirmar essa hipótese alguns pesquisadores observaram o voo noturno *M. genalis* e *M. centralis* nas flores de *Ochroma pyramalidae*, uma Malvaceae rica em néctar da região do Panamá (SMITH et al., 2017). Os autores relataram que as espécies do gênero *Megalopta* visitaram a planta ao pôr do sol (no crepúsculo vespertino) antes dos competidores como *Apoica*, mariposas, morcegos e outras espécies de mamíferos noturnos, que esgotariam o recurso. A atividade de *Megalopta* é reduzida à medida que o crepúsculo astronômico passa (Figura 1), possivelmente devido às limitações ópticas mencionadas. *Megalopta* só aparece novamente no crepúsculo civil (antes de amanhecer), antes da chegada dos competidores diurnos, tirando assim proveito dos abundantes recursos das flores diurnas que começam abrir. No mesmo estudo os autores colocam as abelhas do gênero *Megalopta* ao amanhecer em flores de outra espécie de Malvaceae (*Pseudobombax septenatum*) e registram ataques de abelhas sociais da tribo Meliponini, demonstrando assim que é desvantajoso continuar forrageando quando há interferência de competidores (SMITH et al., 2017).

Outra razão pela qual algumas abelhas possivelmente se tornaram noturnas foi para evitar a predação e o parasitismo (WARRANT, 2007). Essa hipótese ecológica também foi usada para explicar o escape dos morcegos para o nicho noturno (WCISLO et al., 2004). Wcislo e Tierney (2009) mencionam que existe uma grande variedade de

inimigos naturais que atacam as abelhas crepusculares e/ou noturnas, apesar de não serem comparáveis com as legiões de predadores e parasitas generalistas que atacam as abelhas diurnas (como formigas, moscas, besouros e abelhas cleptoparitas). Wcislo e Tierney (2009) relatam que esse escape de predadores e parasitas é uma fuga modesta, já que a curva de sobrevivência de abelhas do gênero *Megalopta* não é muito diferente dos Halictidae diurnos. Por outro lado, foram demonstradas baixas taxas de parasitismo em *Megalopta*, comparado às abelhas diurnas (WCISLO et al., 2004; WCISLO; TIERNEY, 2009). Embora a evidência não seja totalmente clara, em *Megalopta*, a redução do tempo de atividade de forrageamento e o comportamento social primitivo (SMITH; WCISLO; O'DONNELL, 2008) levaram essas abelhas a passar mais tempo dentro de seus ninhos, reduzindo assim possíveis ataques parasitários às células de cria (SMITH et al., 2017).

Um possível fator que ajuda a manter os ninhos protegidos de predadores e parasitas é o comportamento social primitivo em *Megalopta*. Como nas abelhas eusociais existe uma diferenciação primitiva de castas e divisão de tarefas, em que algumas abelhas estão encarregadas de buscar os recursos enquanto outras permanecem como guarda no ninho (SMITH; WCISLO; O'DONNELL, 2008). Por exemplo, em *M. genalis* e *M. ecuadoria*, até 11 indivíduos foram encontrados compartilhando o mesmo ninho (WCISLO et al., 2004). No entanto, ninhos solitários também foram registrados (TREJOS, 2012). Tierney, Gonzales-Ojeda e Wcislo (2008) presumem que o tamanho do corpo determina o *status* reprodutivo nas abelhas crepusculares do gênero *Megalopta*. Smith, Wcislo e O'donnell (2008) mostram que realmente existe uma alta correlação entre tamanho do corpo e o *status* reprodutivo, referindo-se principalmente ao tamanho dos ovários. De acordo com esses autores, abelhas menores provavelmente têm ovários pouco desenvolvidos e sua principal tarefa é forragear e não se reproduzir. Da mesma forma registraram dípteros parasitas do gênero *Fiebrigella* em células de cria de *M. genalis*, cuja ação resulta na redução do tamanho corporal dos indivíduos. Esta seria uma possível via para promover a socialidade nessas abelhas, já que os indivíduos menores tendem a permanecer no ninho como tarefas domésticas.

Para se orientar e navegar em ambientes com condições de pouca luz, as abelhas crepusculares e/ou noturnas investiram em adaptações específicas dos olhos de aposição e dos ocelos, além do uso de pontos de referência, como o dossel das árvores e a posição da lua (KERFOOT, 1967; WARRANT et al., 2006; WARRANT, 2008,

WCISLO; TIERNEY, 2009; WARRANT; DACKER, 2011). No entanto, algumas teorias mostram que animais noturnos não dependem da visão como seu sentido primário e utilizam o olfato, a audição, a eletrorecepção e a mecanorrecepção, para lidar com o habitat em que vivem (WARRANT, 2008).

Knoll e Santos (2012) registraram que as abelhas do gênero *Megalopta* podem ser atraídas por compostos florais que são geralmente usados para atrair abelhas da tribo Euglossini. Nesta pesquisa, os autores coletaram cerca de 960 fêmeas do gênero *Megalopta* utilizando compostos aromáticos entre os quais estavam o acetato de benzilo, eugenol, eucaliptol, salicilato de metilo e a vanilina, sugerindo assim que estas abelhas usam sinais olfativos para encontrar as flores. Esse fato foi confirmado em Cordeiro et al. (2017) e Krug et al. (2018).

Cordeiro et al. (2017) analisaram os principais compostos aromáticos de *Campomanesia phaea* emitidos por flores recém-abertas na madrugada (pico de visita das abelhas noturnas) e às 10:00h (pico de visita das abelhas diurnas). Os autores confirmaram que as flores emitem compostos como álcool benzílico e 2-feniletanol (característicos de plantas noturnas), além de 1-octanol e 1-hexanol que não são restritos a plantas com antese noturna. Esta composição provavelmente explica a atração de visitantes noturnos (abelhas dos gêneros *Zikanapis*, *Ptiloglossa*, *Megalopta* e *Megommation*) e diurnos (como *A. mellifera* e *Melipona*). Este resultado nos estimula a avaliar o papel dos sistemas olfativos nas abelhas crepusculares e noturnas.

Sistema olfativo

O sistema olfativo dos Hexapoda é composto principalmente pelas antenas, que podem ser de 2 tipos: as segmentadas, com segmentos de tamanho semelhantes, exceto pelo último segmento distal comumente encontrado nos entognatas (SCHNEIDER, 1964); e as flagelares, compostas por dois segmentos “basais” chamados escapo e pedicelo, e um flagelo dividido em flagelômeros ou antenômeros, comumente encontradas nas abelhas (Figura 4). Nas diferentes linhagens de insetos existe uma grande variedade de morfologia de antenas, como laminadas, pectinadas, aristadas, capitadas, lameladas, clavadas, plumosas, entre outros (LOUDON, 2009).

Loudon (2009) afirma que uma forma cilíndrica alongada era a condição ancestral das antenas, uma vez que é encontrada em muitos fósseis de Artrópodes,

diferentes dos flagelos em forma de galhos modificados que possuem as mariposas. Schneider (1964) menciona que uma das possíveis razões para o maior comprimento dos segmentos das antenas estaria relacionada ao aumento da superfície disponível para os órgãos sensoriais, conhecidos como sensilas.

O conjunto de unidades básicas chamadas sensilas podem detectar sinais químicos, térmicos e mecânicos do ambiente (NASCIMENTO; SALOMÃO; MARTINS, 2013; GALVANI et al., 2017). Portanto, um inseto pode perceber sinais de compostos químicos dispersos no ar ou detectar sinais físicos com receptores mecânicos. Esta percepção alerta o inseto sobre possíveis predadores, alimento, velocidade do ar, vibrações e limites de sólidos ou líquidos enquanto se movimenta (LOUDON, 2009). A abundância, distribuição, arranjo e os tipos de sensilas dependem das pressões seletivas sofridas pelas espécies em seu nicho ecológico (GALVANI et al., 2017).

Figura 4. Descrição geral da morfologia externa da antena de *Apis mellifera*.

Nos himenópteros, os estudos com antenas remontam aos anos de 1923, com a inovação de técnicas de microscopia óptica. Porém, até o surgimento do microscópio eletrônico de varredura e de transmissão, em 1952 e 1971 respectivamente, foram

publicadas as primeiras micrografias das antenas de operárias de *A. mellifera* (ÅGREN, 1977). O desenvolvimento de métodos matemáticos como a morfometria permitiu o estudo das relações entre a morfologia, biologia e filogenia das abelhas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi estudar as antenas de algumas espécies de abelhas crepusculares e/ou noturnas. Foi feita uma comparação da variação morfométrica dos segmentos antenais destas abelhas com as antenas de abelhas diurnas. Também foi avaliado o efeito alométrico entre o tamanho corpóreo das abelhas e as antenas. Além disso, no capítulo 2 propomos um novo enfoque metodológico para capturar as abelhas crepusculares e noturnas, com base nos voláteis florais, contribuindo assim para acessar a diversidade subestimada deste grupo de abelhas.

Objetivos Específicos

A) Determinar e comparar a variação morfométrica de comprimento, diâmetro e área dos segmentos antenais entre as abelhas noturnas e diurnas.

B) Determinar se existe um efeito alométrico entre o comprimento, diâmetro e área das antenas com o tamanho do corpo das abelhas noturnas.

C) Propor um novo enfoque metodológico para amostrar as abelhas noturnas.

REFERÊNCIAS

- ÅGREN, L. Flagellar sensilla of some Colletidae (Hymenoptera: Apoidea). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 6, n. 3-4, p. 137-146, 1977
- BERRY, R. P.; WCISLO, W. T.; WARRANT, E. J. Ocellar adaptations for dim light vision in a nocturnal bee. **Journal of Experimental Biology** v. 214, n. 8, p. 1283-1293, 2011.
- BURGETT, D. M.; SUKUMALANAND, P. Flight activity of *Xylocopa (Nyctomelitta) tranquebarica*: a night flying carpenter bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Apicultural Research**, v. 39, n. 1-2, p. 75-83., 2000.
- CARDINAL, S.; DANFORTH, B. N. Bees diversified in the age of eudicots. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** v. 280, n. 1755, p. 20122686, 2013.
- CORDEIRO, G. D.; PINHEIRO, M., DÖTTERL, S.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Pollination of *Campomanesia phaea* (Myrtaceae) by night-active bees: a new nocturnal pollination system mediated by floral scent. **Plant Biology**, v. 19, n. 2, p. 132-139, 2017.
- DANFORTH, B. Primer: Bees. **Current Biology**, v. 17, n. 5, p. R156-R161, 2007.
- DANFORTH, B. N.; CARDINAL, S.; PRAZ, C.; ALMEIDA, E. A.; MICHEZ, D. The impact of molecular data on our understanding of bee phylogeny and evolution. **Annual review of Entomology**, v. 58, p. 57-78, 2013.
- DANFORTH, B. N.; MINCKLEY, R. L.; NEFF, J. L.; FAWCETT, F. 2019. **The solitary bees: biology, evolution, conservation**. Princeton University Press: New Jersey, 488p.
- ENGEL, M. S.; RASMUSSEN, C.; GONZALEZ, V. H. Bees. **Encyclopedia of Social Insects**, p. 1–17, 2020. doi:10.1007/978-3-319-90306-4_14-1
- GALVANI, G. L.; GONZÁLEZ-VAQUERO, R. A.; GUERRA-NAVARRO, C.; SETTEMBRINI, B. P. Antennal sensilla of cleptoparasitic and non-parasitic bees in two subfamilies of Apidae. **Apidologie**, v. 48, n. 4, p. 437-449, 2017.
- GREINER, B.; RIBI, W. A.; WARRANT, E. J. Retinal and optical adaptations for nocturnal vision in the halictid bee *Megalopta genalis*. **Cell and tissue research**, v. 316, n. 3, p. 377-390, 2004.
- GREINER, B. Adaptations for nocturnal vision in insect apposition eyes. **International review of cytology**, v. 250, p. 1-46, 2006.

- KERFOOT, W. B. The lunar periodicity of *Sphecodogastra texana*, a nocturnal bee (Hymenoptera: Halictidae). **Animal Behaviour**, v. 15, n. 4, p. 479-486, 1967.
- KELBER, A.; WARRANT, E. J.; PFAFF, M.; WALLÉN, R.; THEOBALD, J. C.; WCISLO, W. T.; RAGUSO, R. A. Light intensity limits foraging activity in nocturnal and crepuscular bees. **Behavioral Ecology**, v. 17, n. 1, p. 63-72, 2006.
- KOCHER, S. D.; PAXTON, R. J. Comparative methods offer powerful insights into social evolution in bees. **Apidologie**, v. 45, n. 3, p. 289-305, 2014.
- KRUG, C.; CORDEIRO, G. D.; SCHÄFFLER, I.; SILVA, C. I.; OLIVEIRA, R.; SCHLINDWEIN, C.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Nocturnal bee pollinators are attracted to guarana flowers by their scents. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1072, 2018.
- KNOLL, F.; SANTOS, L. M. Orchid bee baits attracting bees of the genus *Megalopta* (Hymenoptera, Halictidae) in Bauru region, São Paulo, Brazil: abundance, seasonality, and the importance of odors for dim-light bees. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 56, n. 4, p. 481-488, 2012.
- LOUDON, C. Antennae, p. 21-23. In: Resh, V. H.; Cardé, R. T (Eds.) **Encyclopedia of Insects**. Oxford, Academic Press Elsevier, 1169p, 2009.
- MALERBO-SOUZA, D. T.; SILVA, F. A. S. Comportamento forrageiro da abelha africanizada *Apis mellifera* L. no decorrer do ano. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 33, n. 2, p. 183-190, 2011.
- MICHENER, C. D. **The Bees of the World**. The Johns Hopkins University Press: Baltimore, London, 913p, 2000.
- MCGINLEY, R. J. Studies of Halictinae (Apoidea: Halictidae) II: Revision of *Sphecodogastra*, floral specialists of Onagraceae. **Smithsonian contributions to zoology**, v. 168, n. 2, p. 221-425, 2003.
- NASCIMENTO, F. S.; TANNURE-NASCIMENTO, I. C. Foraging patterns in a nocturnal swarm-founding wasp, *Apoica flavissima* van der Vecht (Hymenoptera: Vespidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 2, p. 177-181. 2005.
- NASCIMENTO, M. A.; SALOMÃO, T. M. F.; MARTINS, G. Estudo comparativo das sensilas antenais de operárias de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae) de diferentes altitudes. **EntomoBrasilis**, v. 6, n. 1, p. 64-67, 2013.

- SOMANATHAN, H.; BORGES, R. M.; WARRANT, E. J.; KELBER, A. Nocturnal bees learn landmark colours in starlight. **Current Biology**, v. 18, n. 21, p. R996-R997, 2008.
- SOMANATHAN, H.; WARRANT, E. J.; BORGES, R. M.; WALLÉN, R.; KELBER, A. Resolution and sensitivity of the eyes of the Asian honeybees *Apis florea*, *Apis cerana* and *Apis dorsata*. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 15, p. 2448-2453, 2009a.
- SOMANATHAN, H.; KELBER, A.; BORGES, R. M.; WALLÉN, R.; WARRANT, E. J. Visual ecology of Indian carpenter bees II: adaptations of eyes and ocelli to nocturnal and diurnal lifestyles. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 195, n. 6, p. 571-583, 2009b.
- SMITH, A. R.; WCISLO, W. T.; O'DONNELL, S. Body size shapes caste expression, and cleptoparasitism reduces body size in the facultatively eusocial bees *Megalopta* (Hymenoptera: Halictidae). **Journal of insect behavior**, v. 21, n. 5, p. 394-406, 2008.
- SMITH, A. R.; KITCHEN, S. M.; TONEY, R. M.; ZIEGLER, C. Is nocturnal foraging in a tropical bee an escape from interference competition?. **Journal of Insect Science**, v. 17, n. 2, p. 62; 1-7, 2017.
- SCHNEIDER, D. Insect antennae. **Annual review of entomology**, v. 9, n. 1, p. 103-122, 1964.
- TIERNEY, S. M.; GONZALES-OJEDA, T.; WCISLO, W. T. Biology of a nocturnal bee, *Megalopta atra* (Hymenoptera: Halictidae; Augochlorini), from the Panamanian highlands. **Journal of Natural History**, v. 42, n. 27-28, p. 1841-1847, 2008.
- TREJOS, M. Determinación Casta-Dominancia en Abejas Nocturnas, *Megalopta genalis* (Hymenoptera). **Centros: Revista Científica Universitaria**, v. 1, n. 1, p. 176-187, 2012.
- URBAN, D.; MOURE J. S.; MELO, G. A. R. Diphaglossini Vachal, 1909. In: Moure, J. S.; Urban, D.; Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. 2012. online versão. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Mar/12/2020.
- VILLANUEVA-G, R.; GONZALEZ, V. H.; AMITH, J.; AYALA, R. Pollen Used by the Nocturnal Sweat Bee *Megalopta tetewana* in Mexico (Hymenoptera: Halictidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 89, n. 3, p. 270-272, 2016.
- WARRANT, E. J.; KELBER, A.; WALLÉN, R.; WCISLO, W. T. Ocellar optics in nocturnal and diurnal bees and wasps. **Arthropod structure & development**, v. 35, n. 4, p. 293-305, 2006.

WARRANT, E. J. Nocturnal bees. **Current Biology**, v. 17, n. 23, p. R991–R992, 2007.doi:10.1016/j.cub.2007.09.009.

WARRANT, E. J. Seeing in the dark: vision and visual behaviour in nocturnal bees and wasps. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 11, p. 1737-1746, 2008.

WARRANT, E.; DACHE, M. Vision and visual navigation in nocturnal insects. **Annual review of entomology**, v. 56, p. 239-254. 2011.

WCISLO, W. T.; ARNESON, L.; ROESCH, K.; GONZALEZ, V.; SMITH, A.; FERNÁNDEZ, H. The evolution of nocturnal behaviour in sweat bees, *Megalopta genalis* and *M. ecuadoria* (Hymenoptera: Halictidae): an escape from competitors and enemies?. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 83, n. 3, p. 377-387, 2004.

WCISLO, W. T.; TIERNEY, S. M. Behavioural environments and niche construction: the evolution of dim-light foraging in bees. **Biological Reviews**, v. 84, p. 19-37, 2009.

CAPITULO 01.

Comparação morfométrica e alométrica dos segmentos antenais entre abelhas noturnas e diurnas

INTRODUÇÃO

Na área da biologia as descrições quantitativas, análises e interpretação da forma são conhecidas como morfometria (ROHLF, 1990). Nessa disciplina as formas analisadas podem ser desde grãos de areias até crânios humanos. Portanto a morfometria é usada em diferentes campos da biologia e das ciências da terra, como citologia, paleobiologia, geologia, botânica, entomologia, antropologia, entre outros (DALY, 1985).

A morfometria está dividida em duas áreas, a morfometria tradicional ou clássica que usada principalmente para medidas lineares e a morfometria geométrica que se baseia em coordenadas cartesianas e pontos anatômicos (MENÉNDEZ; PÉREZ, 2011). Os avanços fundamentais da morfometria estão fortemente ligados ao desenvolvimento de métodos e pacotes estatísticos multivariados, em especial da morfometria geométrica sobre a morfometria tradicional (REIS, 1988; ROHLF, 2000). Nos últimos anos os estudos de morfometria geométrica aumentaram e foram aplicados para resolver problemas de identificação de espécies e subespécies, efeitos ambientais, assimetrias, dimorfismo sexual, entre outros (BENÍTEZ; PÜSCHEL, 2014). No entanto, em estruturas morfológicas externas e internas onde a forma é simplificada a morfometria tradicional pode fornecer evidência estatística de diferenças (PARSONS; ROBINSON; HRBEK, 2003).

Uma das aplicações da morfometria que analisa a relação entre o tamanho de uma característica e o tamanho do corpo de um organismo é conhecida como alometria (WEEDON; PORCH; SYMONDS, 2020). A alometria aborda uma ampla gama de fenômenos que vão desde características morfológicas, fisiológicas até ecológicas e realiza comparações interespecíficas, intraespecíficas e ontogenéticas (PLAVCAN, 2018). Sobretudo nos insetos surgiram diferentes modelos alométricos que são aplicados a uma ampla variedade de organismos (STERN; EMLÉN, 1999; SHINGLETON; MIRTH; BATES, 2008).

Devido à facilidade de medir o exoesqueleto dos insetos e por não apresentar distorções físicas como em animais de corpo mole, a morfometria se torna uma ferramenta vantajosa neste grupo (DALY, 1985). O uso de medidas de comprimento, largura, raio, área e recentemente da forma permitiu identificar instares (FONSECA et al., 2014), sexo e descrição de novas espécies. Além disso, a morfometria auxiliou na

taxonomia e sistemática dos insetos (REIS, 1988), onde os caracteres contínuos são importantes para classificar e revelar a história evolutiva do grupo.

Nos himenópteros em especial nas abelhas os estudos morfométricos estão concentrados em abelhas sociais do gênero *Apis* e da tribo Meliponini. Foi demonstrado, por exemplo, que há uma correlação positiva do comprimento das antenas e nível altimétrico da ocorrência de *Apis cerana* nos Himalayas (MATTU; VERMA, 1983). Também foi encontrado que a distância de voo está fortemente relacionada ao tamanho do corpo em Meliponíneos (ARAÚJO et al., 2004). Com estudos de morfometria é possível identificar espécies, subespécies e linhagens de *Apis* (RINDERER et al., 1993; FRANCOY et al., 2008).

Estudos morfométricos em abelhas noturnas estão focados no sistema ótico, em especial dos ocelos e olhos compostos. Kerfoot (1967) foi um dos primeiros a demonstrar que com ocelos maiores as abelhas precisam menor intensidade luminosa para forragear. No caso de abelhas do gênero *Megalopta*, que vivem em ambientes de floresta densa e fechada, os olhos e omatídeos são maiores em comparação com aquelas que vivem ambientes abertos (OLIVEIRA, 2019). Recentemente Dorey et al. (2020) demonstraram que existem caracteres associados a abelhas que vivem em condições de baixa luminosidade, que permitem separar abelhas diurnas, facultativas noturnas e obrigatórias noturnas.

Pelo contrario, os estudos do sistema olfativo em abelhas noturnas estão concentrados na identificação de voláteis orgânicos florais que atraem estas espécies (CORDEIRO et al., 2017; KRUG et al., 2018). No entanto, na morfometria os estudos são escassos e estão restritos a comparações sensilares de dois espécies de abelhas noturnas *Megalopta insignia* e *Ptiloglossa* sp (MATIELLO, 2008). Nesse estudo, se mostra que as abelhas noturnas apresentam de três a quatro tipos de sensilas, com função principalmente quimiorreceptora e aumentam sua densidade sensilar nos quatro últimos segmentos quando se compara com a espécie diurna *Pseudaugochloropsis graminea*. Schneider (1964) menciona, por exemplo, que a densidade sensilar estaria relacionada com uma maior superfície dos segmentos antenais nos machos de mariposas. Em abelhas, esta hipótese também é usada para explicar as diferenças do comprimento entre machos e fêmeas. Espera-se que o aumento no comprimento da antena esta associado com o aumento de sensilas que permitam melhorar a localização

das fêmeas (WCISLO, 1995). Embora, esta hipótese não foi testada em abelhas noturnas, espera-se que essa maior densidade de sensilas quimiorreceptoras que registra MATIELLO (2008) esteja relacionada com um aumento no tamanho dos segmentos antenais das abelhas noturnas quando se compara com abelhas diurnas.

Baseados nas ideias de que diferenças morfológicas podem estar associadas a pressões ambientais e que um maior comprimento e diâmetro dos segmentos das antenas das abelhas noturnas resulta em uma maior superfície disponível para órgãos sensoriais. Propomos uma análise morfométrica e alométrica comparativa das antenas entre abelhas diurnas e noturnas.

METODOLOGIA

Área de estudo

No presente estudo, as coletas de abelhas noturnas e diurnas foram feitas nos seguintes locais:

Osasco, SP: O município de Osasco está localizado no estado de São Paulo, Brasil (23°28' S, 46°46' W). Apresenta uma precipitação em torno de 2000 mm (MARTINS; NASCIMENTO; FRANCOS, 2018) e a vegetação é composta principalmente por elementos de Mata Atlântica (PENSE; CARVALHO, 2005).

Reserva Biológica de Serra do Japi, Jundiaí, SP: A reserva Biológica Serra do Japi, está localizado no município de Jundiaí no estado de São Paulo (23°14' S, 46°58' W). Apresenta uma precipitação anual de aproximadamente 1.600 mm (PANSARIN; PANSARIN, 2008) e é considerada uma das últimas florestas estacional semidecídua contínua no estado (CARDOSO-LEITE et al., 2005).

Parque Estadual de Campos de Jordão, Campos de Jordão, SP: O Parque Estadual de Campos de Jordão está localizado no município de Campos de Jordão no estado de São Paulo (22° 45' S, e 45° 39' W). A precipitação média anual é de 1804 mm e a vegetação é composta principalmente por Araucária, *Podocarpus*, plantas exóticas e florestas naturais ombrófilas mistas (SOUZA et al., 2012).

Da mesma forma, neste estudo, foram usados materiais de coleções entomológicas, provenientes dos seguintes locais:

Nova Xavantina, MT: O município de Nova Xavantina está localizado no estado de Mato Grosso, no centro-oeste do Brasil (14°40' S, 52°21' W). A precipitação média anual é de 1.750 mm. A vegetação predominante é de Cerrado e florestas de transição Amazônica (SILVA et al., 2010).

Reserva do Morro Grande, SP: A reserva do Morro grande está localizada no município de Cotia do estado de São Paulo, nas coordenadas 23°39'-23°48' S, 47°01'-46°55'W. A precipitação média anual é de 1.400 mm e a flora está constituída por Mata Atlântica, classificada como florestas ombrófila densa e mesófila semidecidual (METZGER et al., 2006).

Parque das neblinas, SP: O Parque das Neblinas está localizado no município de Mogi das Cruzes, no estado de São Paulo (23°44' S, 46°09' W). A precipitação anual varia entre 1600 e 2000 mm. A vegetação que predomina é Mata Atlântica Ombrófila Densa (CORDEIRO et al., 2017).

Mogi das Cruzes, SP: O município de Mogi das Cruzes está localizado na parte leste do estado de São Paulo (23°25' S, 46°100' W). A precipitação anual é de 2000 mm e possui formações naturais da mata atlântica (RODRIGUES, 2018).

Amostragem de abelhas

A coleta das abelhas diurnas e noturnas ocorreu nos meses de julho 2019 (Osasco), de outubro de 2019 a fevereiro de 2020 (Serra do Japi) e em dezembro de 2020 (Parque das Neblinas). Foram oferecidos em papel filtro voláteis orgânicos florais (eugenol, eucaliptol, methyl salicylate, 2-phenylethanol, 1-octanol, 1-hexanole linalool) de acordo com Carvalho et al. (2012), Knoll e Santos (2012), Cordeiro et al. (2017) e Krug et al. (2018) entre 04:00 e 07:00 h para atrair as abelhas, que foram coletadas com redes entomológicas (Figura 1). Estas iscas foram oferecidas com distância de pelo menos 1m entre elas para que não houvesse interferência entre os compostos. A quantidade mínima usada em cada papel de filtro foi de 1 ml, enquanto a máxima foi de 5 ml. As coletas das abelhas diurnas (Figura 2) foram feitas simultaneamente no dia em cada uma das áreas de estudo.

Os gêneros de abelhas noturnas coletados foram: *Ptiloglossa*, *Zikanapis*, *Megommation* e *Megalopta* (Figura 3; Apêndice A, S1). O n amostral requerido de cada espécie foi de 15. Para complementar os 15 indivíduos necessários de cada espécie utilizou-se material da Coleção Entomológica Paulo Nogueira Neto (CEPANN) e Coleção Entomológica Prof. J.M.F. Camargo (RPSP) (Apêndice B, S2). Com exceção de *Apis mellifera*, todas as abelhas diurnas foram obtidas da coleção entomológicas CEPANN (Apêndice B, S2). Os critérios de seleção das abelhas diurnas foram o tamanho semelhante (Tabela 1), e espécies com relação filogenética próxima as abelhas noturnas. Por esse motivo, foram selecionados indivíduos do gênero *Augochloropsis*, de tamanho semelhante e estreita relação filogenética com os gêneros *Megommation* e *Megalopta*, por pertencerem à tribo Augochlorini. No caso de *Ptiloglossa* e *Zikanapis*, por pertencerem à tribo Caupolicanini, o único gênero diurno de tamanho semelhante e filogeneticamente próximo seria *Caupolicana*, no entanto, dada a dificuldade de encontrar indivíduos desse gênero, decidiu-se comparar com gêneros da família Apidae, que têm um tamanho semelhante *Bombus* e *Centris*. Por último, todas as abelhas noturnas foram comparadas com *Apis mellifera*, por ser modelo de estudos morfométricos e ter um horário de atividade amplo.

Tabela 1. Média da distância intertegular das abelhas diurnas e noturnas examinadas.

Espécies	N	Distância Intertegular (mm)
Diurnas		
<i>Apis mellifera</i>	15	$2,647 \pm 0,085$
<i>Augochloropsis cognata</i>	15	$2,001 \pm 0,011$
<i>Bombus brasiliensis</i>	15	$4,219 \pm 0,440$
<i>Centris nitens</i>	15	$4,043 \pm 0,234$
Noturnas		
<i>Megalopta aegis</i>	15	$2,521 \pm 0,033$
<i>Megalopta amoena</i>	15	$2,137 \pm 0,078$
<i>Megommation insigne</i>	15	$3,123 \pm 0,123$
<i>Ptiloglossa latecalcarata</i>	15	$4,591 \pm 0,228$
<i>Zikanapis seabrai</i>	04	$4,484 \pm 0,472$
<i>Zikanapis zikani</i>	03	$4,890 \pm 0,157$

Figura 1. Coleta de abelhas crepusculares e/ou noturnas. **A=** Coletor de prontidão na isca atrativa, **B=** *Megommation insigne* atraída na isca de papel filtro com o composto 2-phenylethanol.

Figura 2. Abelhas diurnas usadas para a comparação morfométrica **A**= *Apis mellifera*, **B**= *Augochloropsis cognata*, **C**= *Bombus brasiliensis*, **D**= *Centris nitens*.

Figura 3. Abelhas crepusculares e/ou noturnas usadas para a comparação morfométrica. **A**= *Megalopta amoena*, **B**= *Megalopta aegis*, **C**= *Megommation insigne*, **D**= *Ptiloglossa latecalcarata*, **E**= *Zikanapis seabrai*, **F**= *Zikanapis zikani*.

Morfometria e Alometria

Foram fotografadas as antenas direitas de cada abelha utilizando um estereomicroscópio motorizado Leica M205A. Com o software do referido equipamento, o comprimento e o diâmetro de cada um dos segmentos das antenas foram medidos (Figura 4A-B). Além disso, foi medida a distância intertegular (Figura 4C) usada como referência para o tamanho do corpo para correlacionar com as outras medidas e determinar o efeito alométrico entre as antenas e o corpo das abelhas.

Com as medidas de comprimento e diâmetro foram calculadas as áreas dos flagelos F_2 a F_9 (Figura 5A). Para calcular a área do segmento apical (F_{10}) foi necessária uma modificação geométrica, que consistiu em medir o comprimento do cilindro e o comprimento apical (Figura 5B). No caso do segmento F_1 , não foi possível realizar o cálculo de área, por falta de fórmulas geométrica que descrevessem a ampla variação desse flagelo. Todos os cálculos foram feitos de acordo com Fonta e Masson (1982).

Figura 4. Medidas aplicadas a cada um dos segmentos das antenas direitas das abelhas coletadas. **A=** Comprimento, **B=** Diâmetro, **C=** Distância intertegular. O número de decimais usados foi **três** e a unidade de medida (**mm**).

A. Modelo geométrico para artigos de F₂ até F₉ em fêmeas do flagelômero

Sendo o artigo de antena um cilindro de altura (h) e diâmetro Ø, sua área é:

$$A: \pi \cdot \varnothing \cdot h$$

B. Modelo geométrico para o artigo F₁₀ em fêmeas do flagelômero

Ø: Diâmetro

h: Altura cilindro

h': Altura apical

a: Eixo pequeno da elipse

b: Eixo maior da elipse

$$A_1: \pi \cdot \varnothing \cdot h$$

$$A_2: \frac{\pi \cdot \varnothing}{2} \left[h' + \frac{1}{2} \sqrt{h'^2 + \varnothing^2} \right]$$

$$A: A_1 + A_2$$

Figura 5. Modelos geométricos para calcular áreas dos segmentos antenais de acordo com Fonta e Masson (1982). **A**= modelo para calcular áreas dos segmentos F₂ a F₉, **B**= modelo para calcular área do segmento F₁₀.

Análises de dados

Realizou-se um teste de normalidade Shapiro-Wilk com os dados de comprimento, diâmetro e área de cada antena no software RStudio. Para conhecer as diferenças morfológicas entre cada segmento das antenas das abelhas diurnas e noturnas foi feito um teste Wilcoxon pareado com um nível de significância de $P \leq 0.05$ para os conjuntos de dados com distribuição não paramétrica. Para conjunto de dados paramétricos foi feito um teste t de student com um nível de significância de $P \leq 0.05$. Adicionalmente foi realizado um teste de similaridade (UPGMA) baseado no índice de similaridade Euclideana para dados morfológico de comprimento, diâmetro e área, junto com um teste de replicas Bootstrap para obter a porcentagem de suporte dos clados.

Para verificar as correlações entre o tamanho e os segmentos antenais, utiliza-se os valores de área dos segmentos F_2 a F_{10} e no Escapo, Pedicelo e F_1 os valores de comprimento. De acordo com a normalidade dos dados, foi feito uma análise de correlação de Pearson, que medi a dependência linear positiva ou negativa de variáveis aleatórias (-1 a -0.50) alta correlação negativa, (-0.49 a 0.49) não existe correlação, (0.50 a 1) alta correlação. Além disso, realizou-se uma análise de regressão linear para com a variável dependente (Distância intertegular) e as variáveis independentes (Segmentos) para observar os efeitos dos segmentos (Coeficientes estimados) sobre o tamanho das espécies noturnas. Para as espécies *Zikanapis seabrai* e *Z. zikani* não foi realizado o análise de regressão linear pelo n amostral baixo.

Os análises e gráficos foram realizados no software RStudio (RSTUDIO TEAM, 2020). As tabelas e os gráficos foram editados em Adobe Illustrator version cc 2018.

RESULTADOS

No total foram examinadas 127 abelhas, 60 diurnas (4 espécies de 4 gêneros) e 67 noturnas (6 espécies de 4 gêneros), sendo cinco espécies de grande porte (tamanho médio maior que 4 mm) e outras cinco de porte médio (tamanho entre 2 e 4 mm). Com exceção das duas espécies de *Zikanapis*, 15 exemplares de cada espécie foram utilizados nas análises. (Tabela 1).

Morfometria do comprimento das antenas

Todos os segmentos antenais das espécies noturnas *M. aegis*, *M. amoena*, *M. insigne* apresentaram maior comprimento quando comparado à abelha diurna *A. cognata* (Tabela 2; Figura 6). Com exceção do comprimento do último flagelômero (F_{10}) da espécie *M. amoena*, todas as medidas tiveram diferenças significativas (Figura 6; Apêndice C, S3).

Nas espécies de grande porte o padrão não é bem claro. Apenas alguns segmentos antenais (F_1 , F_8 , F_9 e F_{10}) em *P. latealcarata* são maiores quando comparados com as espécies diurnas e noturnas (Tabela 2 valores em negrito). Por sua vez, *Bombus brasiliensis* apresentou o comprimento do escapo e F_2 significativamente maior que todas as abelhas de grande porte, inclusive *Z. zikani*, a maior espécie

examinada (Figura 7). No entanto, o pedicelo e o primeiro flagelômero (F_1) de *B. brasiliensis* é significativamente mais curto do que todas as espécies (Apêndice C, S3). Para os outros segmentos não há um padrão claro e os tamanhos variam entre todas as espécies analisadas.

Comparando as medidas dos segmentos das antenas de todas as abelhas noturnas com o modelo diurno de *Apis mellifera*, verificamos que em geral os flagelômeros (F_1 a F_{10}) são maiores nas abelhas noturnas (Tabela 2). Porém o comprimento do escapo de *A. mellifera* é maior comparado ao escapo das três espécies de abelhas noturnas de grande porte (Tabela 2)

Tabela 2. Média e desvio padrão do comprimento de cada segmento das antenas nas espécies de abelhas diurnas e noturnas examinadas. Abelhas de médio porte, abelhas de grande porte e *Apis mellifera*. Valores em mm. Foram examinados 15 indivíduos de cada espécie, com exceção de *Zikanapis*: *Z. seabrai* (4) e *Z. zikani* (3). Em negrito os valores superiores à espécie de referência

Espécie	Escapo	Pedicelo	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀
<i>M. aegis</i>	1,604 ± 0,059	0,207 ± 0,012	0,260 ± 0,043	0,198 ± 0,014	0,286 ± 0,015	0,301 ± 0,013	0,308 ± 0,019	0,311 ± 0,013	0,311 ± 0,009	0,309 ± 0,014	0,309 ± 0,014	0,385 ± 0,026
<i>M. amoena</i>	1,309 ± 0,149	0,192 ± 0,018	0,232 ± 0,026	0,164 ± 0,011	0,243 ± 0,018	0,267 ± 0,019	0,263 ± 0,020	0,270 ± 0,021	0,261 ± 0,019	0,259 ± 0,024	0,242 ± 0,030	0,298 ± 0,044
<i>M. insigne</i>	1,642 ± 0,128	0,227 ± 0,019	0,348 ± 0,024	0,210 ± 0,019	0,226 ± 0,022	0,259 ± 0,021	0,280 ± 0,019	0,298 ± 0,021	0,298 ± 0,018	0,297 ± 0,022	0,268 ± 0,025	0,332 ± 0,034
<i>A. cognata</i>	0,858 ± 0,092	0,132 ± 0,020	0,135 ± 0,029	0,108 ± 0,016	0,127 ± 0,017	0,143 ± 0,019	0,157 ± 0,011	0,178 ± 0,012	0,182 ± 0,012	0,184 ± 0,011	0,193 ± 0,015	0,293 ± 0,035
<i>P. latealcarata</i>	1,162 ± 0,042	0,210 ± 0,017	0,948 ± 0,035	0,208 ± 0,011	0,282 ± 0,011	0,362 ± 0,027	0,365 ± 0,017	0,375 ± 0,017	0,376 ± 0,018	0,389 ± 0,013	0,397 ± 0,017	0,562 ± 0,016
<i>Z. seabrai</i>	1,162 ± 0,008	0,187 ± 0,007	0,792 ± 0,024	0,222 ± 0,014	0,312 ± 0,008	0,358 ± 0,008	0,342 ± 0,006	0,352 ± 0,008	0,360 ± 0,003	0,366 ± 0,005	0,351 ± 0,012	0,456 ± 0,091
<i>Z. zikani</i>	1,217 ± 0,062	0,211 ± 0,003	1,128 ± 0,061	0,236 ± 0,005	0,332 ± 0,006	0,404 ± 0,005	0,403 ± 0,009	0,393 ± 0,016	0,387 ± 0,020	0,368 ± 0,016	0,379 ± 0,033	0,411 ± 0,049
<i>B. brasiliensis</i>	2,098 ± 0,178	0,221 ± 0,017	0,450 ± 0,044	0,304 ± 0,025	0,400 ± 0,035	0,394 ± 0,029	0,386 ± 0,026	0,390 ± 0,031	0,385 ± 0,026	0,374 ± 0,025	0,367 ± 0,027	0,402 ± 0,038
<i>C. nitens</i>	0,722 ± 0,067	0,157 ± 0,014	0,883 ± 0,041	0,218 ± 0,017	0,333 ± 0,018	0,346 ± 0,015	0,342 ± 0,014	0,344 ± 0,015	0,339 ± 0,008	0,344 ± 0,014	0,332 ± 0,022	0,406 ± 0,052
<i>A. mellifera</i>	1,276 ± 0,039	0,184 ± 0,013	0,240 ± 0,018	0,149 ± 0,013	0,295 ± 0,014	0,299 ± 0,014	0,276 ± 0,014	0,263 ± 0,014	0,266 ± 0,014	0,271 ± 0,013	0,264 ± 0,018	0,279 ± 0,025

Figura 6. Diferenças morfométricas do comprimento dos segmentos das antenas da abelha diurna *Augochloropsis cognata* e das abelhas noturnas *Megalopta aegis*, *Megalopta amoena* e *Megommation insigne*. Todas as medidas estão em (mm). O n amostral de todas as espécies é 15. Com exceção de F₁₀ em *M. amoena* todos os valores apresentaram diferenças significativas ($P \geq 0,05$).

Figura 7. Diferenças morfométricas do comprimento dos segmentos das antenas entre as abelhas diurnas *Bombus brasiliensis* e *Centris nitens* e as abelha noturnas *Ptiloglossa latecalcarata*, *Zikanapis seabrai* e *Zikanapis zikani*. Todas as medidas estão em (mm). O n amostral de todas as espécies é 15, com exceção de *Zikanapis*: *Z. seabrai* (4) e *Z. zikani* (3). *= Diferenças estatísticas significativas (P ≥ 0,05).

Morfometria do diâmetro dos flagelômeros

No grupo das abelhas noturnas de porte médio, o diâmetro dos flagelômeros foi maior e estatisticamente significativo em todos os segmentos quando se compara com a espécie diurna *A. cognata* (Tabela 3; Figura 8; Apêndice C, S4).

Da mesma forma, o diâmetro dos flagelômeros nas abelhas noturnas de grande porte mostraram valores médios maiores na maioria dos segmentos quando comparado com as abelhas diurnas. No entanto somente nos segmentos F₄ a F₈ de *P. latealcarata* estes valores foram estatisticamente significativos (Tabela 3; Figura 9; Apêndice C, S4). Na abelha *Z. zikani* (abelha de maior porte examinada) o diâmetro do último segmento antenal (F₁₀) foi significativamente maior comparado à todas as abelhas examinadas (diurnas e noturnas).

Todas as espécies de abelhas noturnas possuem valores médios de diâmetro de cada segmento antenal maior quando comparadas com *Apis mellifera* (Tabela 3).

Tabela 3. Média e desvio padrão do diâmetro dos flagelômeros nas antenas nas espécies de abelhas diurnas e noturnas examinadas. Valores em mm. Foram examinados 15 indivíduos de cada espécie, com exceção de *Zikanapis*: *Z. seabrai* (4) e *Z. zikani* (3). Em negrito os valores superiores à espécie de referência.

Espécie	F ₁ -Inf	F ₁ -Sup	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀
<i>M. aegis</i>	0,158 ± 0,008	0,243 ± 0,013	0,273 ± 0,014	0,258 ± 0,010	0,253 ± 0,010	0,260 ± 0,009	0,263 ± 0,011	0,260 ± 0,007	0,262 ± 0,009	0,262 ± 0,010	0,255 ± 0,014
<i>M. amoena</i>	0,139 ± 0,009	0,216 ± 0,013	0,243 ± 0,014	0,234 ± 0,012	0,240 ± 0,014	0,240 ± 0,012	0,242 ± 0,011	0,240 ± 0,011	0,240 ± 0,011	0,240 ± 0,013	0,228 ± 0,013
<i>M. insigne</i>	0,140 ± 0,008	0,215 ± 0,013	0,246 ± 0,010	0,253 ± 0,011	0,245 ± 0,012	0,249 ± 0,013	0,256 ± 0,013	0,256 ± 0,011	0,253 ± 0,012	0,245 ± 0,007	0,234 ± 0,010
<i>A. cognata</i>	0,112 ± 0,009	0,162 ± 0,011	0,181 ± 0,011	0,193 ± 0,010	0,197 ± 0,010	0,202 ± 0,011	0,212 ± 0,009	0,216 ± 0,008	0,219 ± 0,009	0,216 ± 0,009	0,196 ± 0,011
<i>P. latealcarata</i>	0,199 ± 0,012	0,306 ± 0,009	0,323 ± 0,033	0,314 ± 0,008	0,309 ± 0,010	0,310 ± 0,010	0,311 ± 0,012	0,315 ± 0,014	0,318 ± 0,011	0,322 ± 0,012	0,234 ± 0,014
<i>Z. seabrai</i>	0,164 ± 0,007	0,268 ± 0,004	0,280 ± 0,003	0,272 ± 0,009	0,273 ± 0,004	0,281 ± 0,004	0,288 ± 0,005	0,289 ± 0,005	0,281 ± 0,004	0,282 ± 0,005	0,275 ± 0,002
<i>Z. zikani</i>	0,213 ± 0,048	0,311 ± 0,008	0,328 ± 0,002	0,329 ± 0,002	0,316 ± 0,002	0,307 ± 0,004	0,308 ± 0,008	0,305 ± 0,002	0,309 ± 0,001	0,306 ± 0,006	0,313 ± 0,002
<i>B. brasiliensis</i>	0,152 ± 0,013	0,268 ± 0,017	0,278 ± 0,017	0,262 ± 0,014	0,262 ± 0,014	0,263 ± 0,015	0,265 ± 0,014	0,266 ± 0,015	0,265 ± 0,017	0,265 ± 0,025	0,250 ± 0,031
<i>C. nitens</i>	0,147 ± 0,007	0,253 ± 0,013	0,287 ± 0,017	0,281 ± 0,009	0,274 ± 0,009	0,271 ± 0,006	0,271 ± 0,007	0,269 ± 0,008	0,265 ± 0,010	0,265 ± 0,013	0,244 ± 0,033
<i>A. mellifera</i>	0,113 ± 0,007	0,186 ± 0,006	0,203 ± 0,009	0,194 ± 0,006	0,191 ± 0,004	0,186 ± 0,007	0,186 ± 0,006	0,187 ± 0,005	0,187 ± 0,005	0,188 ± 0,007	0,178 ± 0,009

Figura 8. Diferenças morfométricas do diâmetro dos flagelômeros nas antenas da abelha diurna *Augochloropsis cognata* e das abelhas noturnas *Megalopta aegis*, *Megalopta amoena* e *Megommation insigne*. Todas as medidas estão em (mm). O n amostral de todas as espécies é 15. Todos os valores apresentaram diferenças significativas (P ≥ 0,05).

Figura 9. Diferenças morfométricas do diâmetro dos flagelômeros nas antenas das abelhas diurnas *Bombus brasiliensis* e *Centris nitens* e das abelhas noturnas *Ptiloglossa latecalcarata*, *Zikanapis seabrai* e *Z. zikani*. Todas as medidas estão em (mm). O n amostral de todas as espécies é 15, com exceção de *Z. seabrai* (4) e *Z. zikani* (3). *= Diferenças estatísticas significativas (P ≥ 0,05).

Morfometria da área dos flagelômeros

Nas abelhas noturnas de médio porte a área dos flagelômeros foi significativamente maior quando comparado com a espécie diurna *A. cognata* (Tabela 4; Figura 10; Apêndice C, S5). Nas abelhas de grande porte o padrão não é bem claro. Mas, duas espécies noturnas (*P. latecalcarata* e *Z. zikani*) apresentam valores médios maiores para os segmentos mais distais (F₅-F₁₀), quando comparadas com as duas espécies diurnas (Tabela 4; Figura 11).

Embora a área de todos os flagelômeros de *A. mellifera* seja menor quando se compara com todas as espécies noturnas, a área do segmento F₃ foi similar a *M. insigne*.

Tabela 4. Média e desvio padrão da área dos flagelômeros nas antenas de cada segmento das espécies de abelhas diurnas e noturnas examinadas. Valores em mm. Foram examinados 15 indivíduos de cada espécie, com exceção de *Zikanapis*: *Z. seabrai* (4) e *Z. zikani* (3). Em negrito os valores superiores à espécie de referência.

Espécie	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀
<i>M. aegis</i>	0,167 ± 0,022	0,229 ± 0,026	0,237 ± 0,021	0,248 ± 0,026	0,252 ± 0,019	0,250 ± 0,016	0,251 ± 0,021	0,251 ± 0,018	0,312 ± 0,030
<i>M. amoena</i>	0,125 ± 0,012	0,179 ± 0,021	0,201 ± 0,022	0,198 ± 0,019	0,205 ± 0,022	0,196 ± 0,014	0,195 ± 0,022	0,182 ± 0,024	0,216 ± 0,035
<i>M. insigne</i>	0,163 ± 0,019	0,180 ± 0,018	0,199 ± 0,021	0,219 ± 0,016	0,240 ± 0,023	0,240 ± 0,019	0,236 ± 0,019	0,206 ± 0,015	0,242 ± 0,021
<i>A. cognata</i>	0,062 ± 0,011	0,077 ± 0,013	0,089 ± 0,014	0,100 ± 0,010	0,119 ± 0,011	0,123 ± 0,011	0,127 ± 0,011	0,131 ± 0,013	0,176 ± 0,027
<i>P. latealcarata</i>	0,211 ± 0,026	0,279 ± 0,014	0,352 ± 0,031	0,355 ± 0,022	0,367 ± 0,027	0,372 ± 0,030	0,389 ± 0,018	0,401 ± 0,025	0,564 ± 0,039
<i>Z. seabrai</i>	0,194 ± 0,012	0,267 ± 0,011	0,306 ± 0,006	0,301 ± 0,006	0,319 ± 0,009	0,326 ± 0,005	0,323 ± 0,007	0,210 ± 0,014	0,393 ± 0,080
<i>Z. zikani</i>	0,243 ± 0,006	0,343 ± 0,008	0,402 ± 0,007	0,389 ± 0,004	0,380 ± 0,012	0,370 ± 0,021	0,357 ± 0,015	0,365 ± 0,038	0,418 ± 0,045
<i>B. brasiliensis</i>	0,267 ± 0,036	0,330 ± 0,044	0,325 ± 0,039	0,320 ± 0,037	0,325 ± 0,041	0,322 ± 0,039	0,312 ± 0,039	0,307 ± 0,048	0,305 ± 0,060
<i>C. nitens</i>	0,197 ± 0,020	0,294 ± 0,019	0,298 ± 0,016	0,291 ± 0,012	0,293 ± 0,019	0,287 ± 0,013	0,286 ± 0,020	0,276 ± 0,019	0,305 ± 0,059
<i>A. mellifera</i>	0,095 ± 0,009	0,180 ± 0,010	0,179 ± 0,010	0,161 ± 0,008	0,153 ± 0,009	0,156 ± 0,011	0,159 ± 0,008	0,156 ± 0,011	0,153 ± 0,018

Figura 10. Diferenças morfométricas da área dos flagelômeros nas antenas da abelha diurna *Augochloropsis cognata* e das abelhas noturnas *Megalopta aegis*, *Megalopta amoena* e *Megommation insigne*. Todas as medidas estão em (mm). O n amostral de todas as espécies é 15. Todos os valores apresentaram diferenças significativas ($P \geq 0,05$).

Figura 11. Diferenças morfométricas da área dos flagelômeros nas abelhas diurnas *Bombus brasiliensis* e *Centris nitens* e abelha noturnas *Ptiloglossa latecalcarata*, *Zikanapis seabrai* e *Zikanapis zikani*. Todas as medidas estão em (mm). O n amostral de todas as espécies é 15, com exceção de *Zikanapis*: *Z. seabrai* (4) e *Z. zikani* (3).

Similaridade na morfologia das antenas

A similaridade de acordo com o comprimento dos segmentos da antena das espécies examinadas, agrupam todas as espécies de médio porte, as noturnas *M. insigne*, *M. aegis* e *M. amoena* e diurnas *A. cognata* e *A. mellifera* (Figura 12A). Entre as abelhas de grande porte, *Bombus brasiliensis* aparece isolado das demais, provavelmente devido à diferença no comprimento do escapo e pedicelo, como demonstrado na figura 7.

De acordo com o diâmetro dos flagelômeros, as abelhas diurnas *A. mellifera* e *A. cognata* formam um grupo isolado das demais espécies examinadas (Figura 12B).

Com relação a área dos flagelômeros ocorre dois agrupamentos principais: as abelhas de médio e as abelhas de grande porte. Que por sua vez, dentro do grupo das abelhas de médio porte, as espécies diurnas e noturnas se separaram. Um resultado semelhante é verificado nas abelhas de grande porte, que formam 2 grupos: um com duas espécies noturnas *P. latecalcarata* e *Z. zikani* e outro com suas correspondentes diurnas *C. nitens* e *B. brasiliensis* e *Z. seabrai* (Figura 12C).

Figura 12. Similaridade na morfologia da antena das espécies noturnas e diurnas examinadas com base na distância Euclidiana. **A**= Comprimento dos segmentos, **B**= Diâmetro e **C**= Área dos flagelômeros. Os números dentro dos dendogramas indicam a porcentagem de suporte dos clados de acordo com análise Bootstrap.

Alometria

As análises de correlação e regressão linear mostraram que nas espécies noturnas de porte médio *M. insigne* e *M. amoena* a maioria dos segmentos da antena não possui uma alta correlação com a distância intertegular, e os coeficientes da regressão linear estimado não são induzidos pelo tamanho das espécies (Tabela 5 e 6) (relação alométrica). Porém, a espécie noturna *M. aegis*, apresentou uma alta correlação com distância intertegular, bem como coeficientes estimados estatisticamente significativos na maioria dos segmentos antenais (Escapo, $F_2 - F_9$), exceto pelo segmento F_{10} e pedicelo (Figura 13).

Nas espécies de porte grande *P. latealcarata* não apresenta correlação nem coeficientes lineares estimados significativos com relação à distância intertegular (relação alométrica) (Tabela 5, 6). O índice de correlação de Pearson em *Zikanapis seabrai* e *Z. zikani* mostrou que pode existir uma relação linear entre o escapo e os segmentos F_1 , F_2 , F_5 , F_9 e F_{10} , com a distância intertegular.

Figura 13. Regressão e correlação entre os segmentos antenais da abelha noturna *Megalopta aegis* e a distância intersegmentar. O R^2_{adj} representa a porcentagem de explicação de variável independente. O valor do índice de correlação de **Pearson** está indicado em cada gráfico. *= alta correlação. **Sombreado**= Erro padrão.

Tabela 5. Coeficientes estimados da regressão linear entre os segmentos antenais das abelhas noturnas e a distância intertegular. Em negrito os valores com diferença significativa ($P \leq 0,05$).

Segmentos/Espécies	Escapo	Pedicelo	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀
<i>M. aegis</i>	0,354	0,591	0,153	0,131b	0,961	0,964	0,896	1,272	1,575	1,173	1,231	0,151
<i>M. amoena</i>	-0,206	-0,704	-0,391	0,240	-0,338	-0,188	-0,067	0,383	-1,441	-1,034	-1,002	-1,035
<i>M. insigne</i>	0,362	0,788	1,506	0,128	4,151	1,020	3,425	2,235	2,469a	3,401	1,149	-1,176
<i>P. latecalcarata</i>	0,236	0,613	1,868	1,751	3,060	1,926	2,744	2,400	3,259	3,121	3,682	2,351

Tabela 6. Coeficiente de correlação de Pearson entre os segmentos antenais das abelhas noturnas e a distância intertegular. Em negrito os valores com alta correlação.

Segmentos/Espécies	Escapo	Pedicelo	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀
<i>M. aegis</i>	0,63	0,21	0,20	0,74	0,74	0,61	0,72	0,75	0,75	0,73	0,67	0,14
<i>M. amoena</i>	-0,40	-0,16	-0,13	0,04	-0,09	-0,05	-0,02	0,11	-0,26	-0,30	-0,32	-0,47
<i>M. insigne</i>	0,38	0,12	0,29	0,02	0,59	0,17	0,45	0,41	0,38	0,52	0,14	-0,2
<i>P. latecalcarata</i>	0,04	0,05	0,29	0,20	0,19	0,26	0,26	0,29	0,42	0,24	0,40	0,40
<i>Z. seabrai</i>	-0,90	-0,57	0,81	-0,71	0,10	0,04	0,87	-0,41	0,31	0,36	1,00	0,61
<i>Z. zikani</i>	-0,93	-0,37	-0,93	-1,00	-0,99	-0,30	-0,52	-0,98	-0,93	-0,48	-0,73	-0,93

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que as abelhas noturnas de porte médio e a abelha de grande porte *P. laticarata* possuem o comprimento, o diâmetro e a área dos segmentos antenais maiores quando se compara com as espécies diurnas de tamanhos semelhantes. Além disso, verificou-se que o tamanho dos segmentos antenais não apresenta correlação com o tamanho do corpo, em três espécies noturnas, *M. amoena*, *M. insigne* e *P. laticarata*.

Nas abelhas noturnas, os estudos morfométricos estão enfocados no sistema visual, já que existem especializações dos ocelos e olhos compostos de aposição que permitem melhorar a navegação e orientação em ambientes com condições de pouca luz (GREINER; RIBI; WARRANT, 2004; WARRANT et al., 2006; SOMANATHAN et al., 2009; BERRY; WCISLO; WARRANT, 2011). Avanços na morfometria geométrica permitiram determinar diferenças entre os olhos, ocelo e cabeça de abelhas noturnas do gênero *Megalopta* de diferentes biomas (OLIVEIRA, 2019), e identificaram caracteres que distinguem as abelhas obrigatoriamente noturnas, de crepusculares e diurnas, os quais são: a densidade de omatídeos, a proporção entre a cabeça e o olho, área total do rosto, a largura do ocelo médio e a proporção entre a largura do ocelo médio e a distância ocelo-ocular (DOREY et al., 2020).

Estudos recentes sobre o sistema olfatório das abelhas noturnas identificou os voláteis orgânicos florais percebidos associando com o processo de forrageamento destas abelhas (CORDEIRO et al., 2017; KRUG et al., 2018) (Ver Capítulo 2). Os estudos morfométricos no sistema olfatório das abelhas noturnas são escassos. Os poucos existentes estão restritos a comparações das sensilas de duas espécies *M. insignia* e *Ptiloglossa* sp., onde se demonstrou que essas espécies apresentam menos sensilas, quando se compara com abelhas eusociais como *A. mellifera* e abelhas do gênero *Melipona* (MATIELLO, 2008). Seguido de descrições taxonômicas, que usam a cor e comparações do comprimento em termos de proporções dos segmentos escapo, pedicelo e os quatro primeiros flagelômeros para a construção de chaves taxonômicas (MOURE, 1958; GONZALEZ; GRISWOLD; AYALA, 2010; SANTOS; MELO, 2015). No entanto, essa informação não permite correlacionar à variação morfométricas da antena destas abelhas com o hábito de vida noturno.

As análises morfométricas comparativas entre abelhas diurnas e noturnas mostram que as abelhas noturnas de porte médio *M. aegis*, *M. amoena* e *M. insigne* apresentam valores maiores nas medidas de comprimento, diâmetro e área dos segmentos antenais, quando se compara com a espécie diurna *A. cognata* (Tabela 2). Porém em abelhas de grande porte como *P. latealcarata* o padrão é diferente e os segmentos antenais significativamente maiores estão restritos aos últimos segmentos flagelômeros ($F_5 - F_{10}$). Essa diferença pode estar relacionada com o número de sensilas que estas abelhas possuem. Por exemplo, em mariposas e machos de abelhas sociais, as diferenças do tamanho dos segmentos antenais com as fêmeas estão correlacionadas com um maior número de sensilas quimiorreceptoras necessárias para detectar a fêmea (SCHNEIDER, 1964; WCISLO, 1995). Em abelhas noturnas que usam pistas olfativas para encontrar as fontes de alimentos, como registrado em Cordeiro et. (2017) e Krug et. (2018), este fenômeno pode ser similar. Matiello (2008) mostra que o número e tipo de sensilas em espécies do gênero *Ptiloglossa*, são mais abundantes nos cinco últimos flagelômeros. No entanto, no escapo, pedicelo e os primeiros dois flagelômero só apresentam sensilas de tipo tricóides, que podem ser mecanorreceptores ou quimiorreceptores. Esse padrão de densidade sensilar também é observado em outras espécies de abelhas. Por exemplo, na abelha eusocial *Melipona scutellaris* (NASCIMENTO; SALOMÃO; MARTINS, 2013) ou em abelhas da tribo Emphorini, nos gêneros *Melitoma*, *Diadasina* e *Ancylocelis*, onde a densidade sensilar máxima concentra-se nos últimos três flagelômeros (GALVANI et al., 2012). Isso explicaria padrão morfométrico dos segmentos de *P. latealcarata*, das abelhas noturnas de porte médio e o diâmetro significativamente maior do flagelômero F_{10} de *Z. zikani*.

Ao contrario, os valores médios de comprimento e área do escapo, foram maiores na espécie diurna *B. brasiliensis*. Fato que também se registrou no comprimento do modelo de estudo *A. mellifera* quando comparada com as abelhas noturnas de porte médio. Este resultado pode estar relacionado com a função do escapo e o grau de socialidade das espécies comparadas (WCISLO, 1995). Em *Bombus* e abelhas sociais o escapo está coberto por placas de pelos e sensilas tricóides que tem função mecanorreceptora, ou seja, permite regular raio, a direção e a posição da antena de acordo com a posição do corpo (FONTA; MASSON, 1982; FIALHO et al., 2014). Essa função do escapo é importante no comportamento destas abelhas, já que a posição da antena permite uma comunicação ativa dentro da colmeia para a distribuição das

tarefas (ERBER et al., 1997). Um maior comprimento do escapo das abelhas noturnas de porte médio quando comparadas com as noturnas de grande porte, também pode estar relacionado ao comportamento destas abelhas. Em abelhas do gênero *Megalopta*, o comportamento social também foi registrado (WCISLO; GONZALEZ, 2006), e o movimento e posição das antenas, que segundo Trejo (2012) poderiam estar relacionados com o reconhecimento intraespecífico.

No agrupamento das espécies com base nas medidas analisadas (Figura 12) a área fornece dados suficientes para separar as espécies noturnas das diurnas e as espécies noturnas de grande porte daquelas de médio porte. Embora, o comprimento e o diâmetro agrupem algumas espécies de abelhas noturnas, o padrão de agrupamento não é claro. As semelhanças entre as áreas dos segmentos das abelhas noturnas, demonstram que as abelhas que vivem em ambientes com condições de pouca luz, tendem possuir segmentos antenais com superfícies maiores.

As análises de regressão e correlação entre os segmentos antenais e a distância intertegular, tomada como medida de tamanho, demonstraram que a maioria dos segmentos antenais nas abelhas noturnas, *M. insigne*, *M. amoena* e *P. latealcarata*, não possuem uma correlação com o tamanho do corpo. Nas abelhas de grande porte *Z. seabrai* e *Z. zikani*, o n amostral não permitiu realizar as análises de regressão, no entanto a correlação de Pearson mostrou valores altamente correlacionados em *Z. zikani*. Este resultado sugere que o tamanho dos segmentos antenais em algumas das espécies noturnas não está completamente determinado pelo tamanho do corpo e sim pelo nicho ecológico como acontece na formiga *Solenopsis invicta* (ARAÚJO; TSCHINKEL, 2010).

Para concluir, nosso estudo mostra que as abelhas com atividade de forrageamento em ambientes de pouca luz possuem segmentos antenais maiores comparados às abelhas diurnas, sobretudo nos três últimos segmentos (F_8 , F_9 e F_{10}) onde geralmente encontra-se a maior densidade de sensilas. Além disso, a área dos segmentos em três espécies noturnas não é influenciada pelo tamanho das abelhas e sim possivelmente por uma função ecológica no ambiente em que vivem. Embora o tamanho dos segmentos das abelhas noturnas pressuponha um maior número de sensilas, este fato precisa ser verificado com microscopia eletrônica de varredura das antenas.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. D.; COSTA, M.; CHAUD-NETTO, J.; FOWLER, H. G. Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): inference of flight range and possible ecological implications. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 3B, p. 563-568, 2004.
- ARAUJO, M. B.; TSCHINKEL, W. R. Worker allometry in relation to colony size and social form in the fire ant *Solenopsis invicta*. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2010.
- BENÍTEZ, H. A.; PÜSCHEL, T. A. Modelando la varianza de la forma: morfometría geométrica aplicaciones en biología evolutiva. **International Journal of Morphology**, v. 32, n. 3, p. 998-1008, 2014.
- BERRY, R. P.; WCISLO, W. T.; WARRANT, E. J. Ocellar adaptations for dim light vision in a nocturnal bee. **Journal of Experimental Biology** v. 214, n. 8, p. 1283-1293, 2011.
- CARDOSO-LEITE, E.; PAGANI, M. I.; MONTEIRO, R.; HAMBURGER, D. S. Ecologia da paisagem: mapeamento da vegetação da Reserva Biológica da Serra do Japi, Jundiaí, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2005.
- CORDEIRO, G. D.; PINHEIRO, M.; DÖTTERL, S.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Pollination of *Campomanesia phaea* (Myrtaceae) by night-active bees: a new nocturnal pollination system mediated by floral scent. **Plant Biology**, v. 19, n. 2, p. 132-139, 2017.
- DALY, H. V. Insect morphometrics. **Annual review of entomology**, v. 30, p. 415-438, 1985.
- DECANINI, M. M. S. SIG no planejamento de trilhas no parque estadual de Campos do Jordão. **Revista Brasileira de Cartografia**, v. 53, n. 1, 2001.
- DOREY, J. B.; FAGAN-JEFFRIES, E. P.; STEVENS, M. I.; SCHWARZ, M. P. Morphometric comparisons and novel observations of diurnal and low-light-foraging bees. **Journal of Hymenoptera Research**, v. 79, p. 117-144, 2020.
- ERBER, J.; PRIBBENOW, B.; GRANDY, K.; KIERZEK, S. Tactile motor learning in the antennal system of the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Journal of Comparative Physiology A**, vol. 181, no 4, p. 355-365, 1997.
- FIALHO, M. D. C. Q.; GUSS-MATIELLO, C. P.; ZANUNCIO, J. C.; CAMPOS, L. A. O.; SERRÃO, J. E. A comparative study of the antennal sensilla in corbiculate bees. **Journal of Apicultural Research**, vol. 53, no 3, p. 392-403, 2014.

- FONSECA, A. J.; MENEZES, C. W. G. D.; SANTOS, C. A. D.; ASSIS JÚNIOR, S. L. D.; FONSECA, A. G.; SOARES, M. A. Morfometria de pupas e adultos de *Rhinochenus stigma* Linnaeus 1758 (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Árvore**, v. 38, n. 1, p. 25-30, 2014.
- FONTA, C.; MASSON, C. Analyse de l'équipement sensorial antennaire du bourdon *Bombus hypnorum* L. **Apidologie**, v. 13, p. 247-263, 1982.
- FRANCOY, T. M.; WITTMANN, D.; DRAUSCHKE, M.; MÜLLER, S.; STEINHAGE, V.; BEZERRA-LAURE, M. A.; GONÇALVES, L. S. Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. **Apidologie**, v. 39, n. 5, p. 488-494, 2008.
- GALVANI, G. L.; GONZÁLEZ, A.; ROIG-ALSINA, A. H.; SETTEMBRINI, B. P. Distribution and morphometric studies of flagellar sensilla in Emphorini bees (Hymenoptera, Apoidea). **Micron**, v. 43, n. 5, p. 673-687, 2012.
- GONZALEZ, V. H.; GRISWOLD, T.; AYALA, R. Two new species of nocturnal bees of the genus *Megalopta* (Hymenoptera: Halictidae) with keys to species. **Revista de Biología Tropical**, vol. 58, no 1, p. 255-263, 2010.
- GREINER, B.; RIBI, W. A.; WARRANT, E. J. Retinal and optical adaptations for nocturnal vision in the halictid bee *Megalopta genalis*. **Cell and tissue research**, v. 316, n. 3, p. 377-390, 2004.
- KERFOOT, W. B. Correlation between ocellar size and the foraging activities of bees (Hymenoptera; Apoidea). **The American Naturalist**, v. 101, n. 917, p. 65-70, 1967.
- KRUG, C.; CORDEIRO, G. D.; SCHÄFFLER, I.; SILVA, C. I.; OLIVEIRA, R.; SCHLINDWEIN, C.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Nocturnal bee pollinators are attracted to guarana flowers by their scents. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1072, 2018.
- LIPORONI, R.; CORDEIRO, G. D.; PRADO, P. I.; SCHLINDWEIN, C.; WARRANT, E. J.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Light intensity regulates flower visitation in Neotropical nocturnal bees. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.
- MARTINS, G. N.; NASCIMENTO, A. P. B.; FRANCO, M. S. **Prática de cultivo e uso de recursos vegetais em quintais residenciais na Vila Jaguaribe em Osasco, SP**. In: **Fórum Ambiental Alta Paulista**, nº 14, 2018, edição online, trabalhos aprovados, edição online: ANAP-Promovendo a conscientização ambiental, 2018, p. 526-538.

- MATIELLO, C. P. G. (2008). **Estudo comparado das sensilas nas antenas de abelha**. Teses de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 58p., 2008.
- MATTU, V. K.; VERMA, L. R. Comparative morphometric studies on the Indian honeybee of the north-west Himalayas 1. Tongue and antenna. **Journal of Apicultural Research**, v. 22, n. 2, p. 79-85, 1983.
- MENÉNDEZ, L.; PÉREZ, S. I. Información morfométrica en estudios interpopulacionales: una comparación de técnicas basadas en proporciones y coordenadas Procrustes. **Revista Argentina de Antropología Biológica**, v. 13, n. 1, p. 105-111, 2011.
- METZGER, J. P.; ALVES, L. F.; GOULART, W.; TEIXEIRA, A. M. D. G.; SIMÕES, S. J. C.; CATHARINO, E. L. M. Uma área de relevante interesse biológico, porém pouco conhecida: a Reserva Florestal do Morro Grande. **Biota neotropical**, v. 6, n. 2, p. 0-0, 2006.
- MOURE, J. S. (1958). On the species of *Megalopta* described by F. Smith (Hymenoptera, Apoidea). **Journal of the New York Entomological Society**, vol. 66, no 3/4, p. 179-190, 1958.
- NASCIMENTO, M. A.; SALOMÃO, T. M. F.; MARTINS, G. Estudo comparativo das sensilas antenais de operárias de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae) de diferentes altitudes. **EntomoBrasilis**, v. 6, n. 1, p. 64-67, 2013.
- OLIVEIRA, P. S. **Morfologia do sistema visual de cinco espécies de abelhas noturnas do gênero *Megalopta* e as relações com o ambiente onde vivem**. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo – FFCLRP, Ribeirão Preto, 75p., 2019.
- PANSARIN, E. R.; PANSARIN, L. M. The family Orchidaceae in the Serra do Japi, São Paulo, Brazil. **Rodriguésia**, v. 59, n. 1, p. 99-111, 2008.
- PARSONS, K. J.; ROBINSON, B. W.; HRBEK, T. Getting into shape: an empirical comparison of traditional truss-based morphometric methods with a newer geometric method applied to New World cichlids. **Environmental Biology of Fishes**, v. 67, n. 4, p. 417-431, 2003.
- PENSE, M. R.; CARVALHO, A. P. C. Biodiversidade de aves do Parque Estadual do Jaraguá (SP). **ConScientiae Saúde**, n. 4, p. 55-61, 2005.
- PLAVCAN, J. M. Allometry and body size. **The International Encyclopedia of Biological Anthropology**, p. 1-7, 2018.
- REIS, S. F. D. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 5, n. 4, p. 571-580, 1988.

- RINDERER, T. E.; BUCO, S. M.; RUBINK, W. L.; DALY, H. V.; STELZER, J. A.; RIGGIO, R. M.; BAPTISTA, F. C. Morphometric identification of Africanized and European honey bees using large reference populations. **Apidologie**, v. 24, n. 6, p. 569-585, 1993.
- ROHLF, F. J. Morphometrics. **Annual Review of Ecology and systematics**, v. 21, p. 299-316, 1990.
- ROHLF, F. J. Statistical power comparisons among alternative morphometric methods. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 111, n. 4, p. 463-478, 2000.
- RODRIGUES, F. P. Identificação das áreas prioritárias para conservação no entorno do parque das neblinas, Mogi das Cruzes, SP/fase I. **Revista Científica UMC**, v. 3, n. 3, p. 5, 2018.
- R STUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>., 2020.
- SILVA, M. A. B. D.; MELO, L. V. L.; RIBEIRO, R. V.; SOUZA, J. P. M. D.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. D. O.; SILVA, R. M. D. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 549-562, 2010.
- SOMANATHAN, H.; KELBER, A.; BORGES, R. M.; WALLÉN, R.; WARRANT, E. J. Visual ecology of Indian carpenter bees II: adaptations of eyes and ocelli to nocturnal and diurnal lifestyles. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 195, n. 6, p. 571-583, 2009.
- SOUZA, R. P. M. D.; SOUZA, V. D. C.; POLISEL, R. T.; IVANAUSKAS, N. M. Estrutura e aspectos da regeneração natural de Floresta Ombrófila Mista no Parque Estadual de Campos do Jordão, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 39, n. 3, p. 387-407, 2012.
- SHINGLETON, A. W.; MIRTH, C. K.; BATES, P. W. Developmental model of static allometry in holometabolous insects. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 275, n. 1645, p. 1875-1885, 2008.
- SCHNEIDER, D. Insect antennae. **Annual review of entomology**, v. 9, n. 1, p. 103-122, 1964.
- STERN, D. L.; EMLÉN, D. J. The developmental basis for allometry in insects. **Development**, v. 126, n. 6, p. 1091-1101, 1999.
- TREJOS, M. Determinación Casta-Dominancia en Abejas Nocturnas, *Megalopta genalis* (Hymenoptera). **Centros: Revista Científica Universitaria**, v. 1, n. 1, 176-187, 2012.

WARRANT, E. J.; KELBER, A.; WALLÉN, R.; WCISLO, W. T. Ocellar optics in nocturnal and diurnal bees and wasps. **Arthropod structure & development**, v. 35, n. 4, p. 293-305, 2006.

WEEDON, S.; PORCH, N.; SYMONDS, M. R. Evolution of male antennal size in moths (Lepidoptera): a comparative test of potential trade-offs and correlated growth in Australian species. **Austral Entomology**, v. 59, n. 1, p. 156-166, 2020.

WCISLO, W. T. Sensilla numbers and antennal morphology of parasitic and non-parasitic bees (Hymenoptera: Apoidea). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 24, n. 1, p. 63-81, 1995.

WCISLO, W. T.; GONZALEZ, V. H. Social and ecological contexts of trophallaxis in facultatively social sweat bees, *Megalopta genalis* and *M. ecuadoria* (Hymenoptera, Halictidae). **Insectes Sociaux**, vol. 53, no 2, p. 220-225, 2006.

CAPÍTULO 02.

Floral volatiles: a promising method to access the rare nocturnal and crepuscular bees

Este capítulo foi submetido na forma de artigo completo para a revista “Frontiers Ecology and Evolution”, para uma edição especial do volume “Sensory Ecology of Plant-Pollinator Interactions”.

Floral volatiles: a promising method to access the rare nocturnal and crepuscular bees

Carlos A. Martínez-Martínez¹, Guaraci D. Cordeiro², Herbeson O. J. Martins¹, Renan K. O. A. Cardoso¹, Paulo Milet-Pinheiro³, Mariana A. Stanton⁴, Emanuella L. Franco⁵, Cristiane Krug⁶, Sidnei Mateus¹, Clemens Schlindwein⁷, Stefan Dötterl², Isabel Alves-dos-Santos⁸

¹Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Department of Biosciences, Plant Ecology, University of Salzburg, Salzburg, Austria

³Laboratório de Ecologia, Universidade de Pernambuco (Campus Petrolina), 56328-900 Petrolina, Brazil

⁴Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências da Natureza, Senhor do Bonfim, Bahia, Brazil

⁶Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA).

⁷Departamento de Botânica, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

⁸Departamento de Ecologia, IBUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Crepuscular and/or nocturnal bees fly during the dusk, the dawn or part of the night. Due to the short time of foraging and sampling bias towards diurnal bees, nocturnal bees are rarely collected and poorly studied. So far, they have been mostly sampled with light and Malaise traps. However, synthetic chemical compounds resembling floral volatiles were recently found as a promise alternative to attract these bees. By reviewing available and collecting original data, we present information on nocturnal bees attracted and sampled with scent-baited traps. Bees were actively captured with entomological nets while approaching to the filter paper moistened with chemical compound or passively caught in bottles with scent baits left during the night. So far, all data available are from the Neotropics. Nocturnal bees belonging to three genera, i.e. *Ptiloglossa*, *Megalopta* and *Megommation*, were attracted by floral volatiles or caught in the traps with chemical compounds. They were attracted to at least 10 different

synthetic compounds and mixtures thereof identified from bouquet of flowers with nocturnal anthesis. Aromatic compounds, such as 2-phenyletanol, eugenol and methyl salicylate, and the monoterpenoid eucalyptol were the most successful in attracting nocturnal bees. We highlight the effectiveness of olfactory methods to survey crepuscular and nocturnal bees using chemical compounds typically reported as floral scent constituents and the possibility to record the preferences of each species to specific compounds. We believe that the use of this method might be included in apifauna surveys to improve our current knowledge on the diversity of nocturnal bees in different ecosystems.

KEYWORDS: Nocturnal bees inventory, crepuscular bees, apifauna survey, sampling method, floral scents, volatile organic compounds, 2-phenylethanol.

INTRODUCTION

The nocturnal and/or crepuscular behavior in bees arose independently in four of the seven bee families: Andrenidae, Apidae, Colletidae and Halictidae (Wcislo et al., 2004; Warrant, 2007; Danforth et al., 2019). These bees can be obligatory nocturnal, such as the giant Indian bee *Xylocopa tranquebarica* (Burgett and Sukumalanand, 2000), or crepuscular, those that fly forage for pollen and nectar at dawn or dusk, such as *Megalopta* and *Ptiloglossa* (Warrant, 2007). Furthermore, under ideal moonlight conditions and cloud cover, the crepuscular period is extended allowing “crepuscular bees” the search for food also during the night (Kerfoot, 1967; Somanathan et al., 2008; Liporoni et al., 2020). The main anatomical characteristics that indicate nocturnal and/or crepuscular behavior in these bees are the large size of their ocelli and compound eyes, as well as the high number of ommatidias (Kelber et al., 2006; Warrant et al., 2006; Berry et al., 2011), characteristics that improve visual orientation in low light conditions (Wcislo et al., 2004).

Nocturnal and/or crepuscular bees (hereafter referred to as nocturnal bees) are usually under sampled, due to the brief window of activity at dusk/dawn or during the night (Wcislo et al., 2004). As a consequence, representativeness of these bees in insect collections are normally scarce. Many of the nocturnal bees collected so far have been captured with light traps using white light tubes, modified Pennsylvania black light,

ultraviolet light (UV), mercury vapor lamps (Chandler, 1961; Wolda and Roubik, 1986) or malaise traps (Ferrari et al., 2016).

About a decade, synthetic compounds that are broadly applied in male orchid bee (*Euglossini*) surveys were fortuitously found to also sample nocturnal bees (Carvalho et al., 2012; Knoll and Santos, 2012) and, more recently, nocturnal bees were effectively lured with compounds (individually or as blends) resembling floral volatiles of some night-blooming host plants of these bees (Cordeiro et al., 2017; Krug et al., 2018). Furthermore, during pollination studies at night, sometimes nocturnal bees are recorded on flowers (Hopkins et al., 2000; Somanathan and Borges, 2001; Franco and Gimenes, 2011; Soares and Morellato, 2018; Cordeiro et al., 2017; Krug et al., 2015).

Light traps are efficiently used in the documentation of nocturnal bees, as well as in determining seasonal patterns of other insects (Wolda and Roubik, 1986; Abbas et al., 2019). However, one of the disadvantages is the high cost of batteries or power generators and lamps with different types of lights necessary for operating the trap. Likewise, these traps tend to be generalist, attracting various types of insects that are not the object of study and, and trapping is strongly affected by abiotic variables such as moon phases and climate (Nowinszky and Puskás, 2017). Furthermore, these traps are fragile and pose danger to the collector due to UV radiation emitted and toxicity of mercury (Price and Baker, 2016).

Due to the general scarcity of captured specimens of nocturnal bees in insect collections, our current knowledge about their diversity is still underestimated. In this study, we propose a methodological protocol to improve the sampling of nocturnal bees, an approach that will record information on their diversity and chemical preferences by each species. We provide new records and a compilation of literature data on nocturnal bees lured with chemical compounds.

MATERIAL AND METHODS

Nocturnal bee sampling

Nocturnal bees were sampled with synthetic chemical compounds from July 2019 to January 2020 in Osasco municipality (23°28' S, 46°46' W), São Paulo State, Brazil and at Municipal Reserve Serra do Japí (23°14' S, 46°58' W), Jundiaí

municipality, São Paulo State, Brazil. The chemical compounds were added to filter papers and disposed on tree or shrubs branches at a height between 1.5 to 2m above the ground. Bees were collected with an entomological net while approaching to filter paper with chemical compounds (for illustration see Figure S1A). We offered compounds resembling floral volatiles previously identified as attractants to nocturnal bees (Cordeiro et al. 2017; Krug et al. 2018), i.e. 1-hexanol (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), 2-phenylethanol (Acros Organics, 99%), 1-octanol (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$) and linalool (Sigma-Aldrich, 97%). The samples were carried out in the field between 04:00 and 6:00am (before sunrise), and between 05:00 and 07:00pm (by sunset). Approximately 1ml of the chemical compound was added to filter papers. We are calling this sampling as active method.

The bees collected were mounted and identified with the taxonomic keys proposed by Moure (1945), Moure (1964), Santos and Silveira (2009), Gonçalves and Santos (2010), Gonzalez et al. (2010) and Santos and Melo (2015) and deposited in the Paulo Nogueira-Neto Entomological Collection at the University of São Paulo (CEPANN), in São Paulo. Additionally, we performed electroantennographic assays (EAG) with two individuals of *Megommation insigne* to evaluate antennal responses of this nocturnal bee to 2-phenylethanol (a compound identified in plants with nocturnal anthesis) and to synthetic mixture resembling the floral scent bouquet of *Campomanesia phaea* (see the detailed methods in the Supplementary material).

Literature review

A systematic review of the literature on nocturnal bees lured with chemical compounds was conducted on Google Scholar, JSTOR, NCBI, Scopus and Web of science, with the following combinations of keywords: "Compounds" OR "Chemical lures" OR "Floral scent" OR "Floral volatile" OR "Nocturnal bees" OR "Nocturnal and Crepuscular bees" OR "Nocturnal anthesis" OR "Volatile organic compounds". From the selected articles (Table S1 of the Supplementary material), information about the species, number of individuals, attractive floral compounds, biomes and sampling methods were recovered. In these studies, the nocturnal bees were mostly sampled with scent traps (similar to those used to Euglossini bees) left during the night. The traps are built with PET bottles, which a cotton ball impregnated with a synthetic compound inserted (for illustration see Supplementary Figure S1B). Chemical compounds,

originally used as lures for Euglossini bees, were used: eucalyptol (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$), eugenol (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$) and methyl salicylate (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$). We are calling this sampling as passive method.

RESULTS

By the present study and previous studies, overall 1215 individuals of 14 species of nocturnal bees were attracted by chemical compounds. The genus with the highest number of individuals and species captured was *Megalopta* (1050 individuals, 9 species) (Table 1 and 2).

The active sampling method attracted 103 individuals belonging to ten species of nocturnal bees, mainly *Megommation insigne* (33 individuals) (Table 1). Most individuals (39 individuals) were attracted by the aromatic compound 2-phenylethanol (Table 1; Figure 1).

The passive method attracted 1012 individuals, among them *Megalopta amoena* and *M. guimaraesi*, which accounted together for 994 individuals (Table 2).

The aromatic compounds eugenol and methyl salicylate trapped 530 individuals from 4 species and 233 individuals from 5 species, respectively (Table 2). The only monoterpene tested as single compound, eucalyptol, attracted 152 individuals of three species of *Megalopta*. The aliphatic compound 1-octanol, attracted bees of the genera *Megommation* and *Ptiloglossa*. The different mixtures of compounds tested so far attracted 57 individuals from seven species, including some unique species, such as *Megalopta cuprea* and *M. piraha* that were so far only collected with specific mixtures, but not single compounds. Compounds from other chemical classes, such as irregular terpenes and nitrogen-bearing compounds, attracted only few bees (4 individuals) (Table 2, Figure 1).

Figure 1. Percentage of individuals per bee species attracted previously by volatile organic substances of various classes of chemical compounds (see also Table 1 and 2). The total number of individuals collected from each species is given in parentheses

Table 1. Records of crepuscular and nocturnal bee species lured with volatile organic compounds and collected with active method. All the specimens collected are female, except *Ptiloglossa pretiosa*.

Bees - Family/Species	Number of individuals	Biome	Compounds	Class of compound	Reference
Colletidae					
<i>Ptiloglossa latealcarata</i> Moure	10	ARF	Mix1	Aro-Ali	1
	2		1-octanol	Ali	1
<i>Ptiloglossa pretiosa</i> Friese	2♂	ARF	2-phenylethanol	Aro	
<i>Ptiloglossa</i> sp.1	15	ARF	2-phenylethanol	Aro	
<i>Ptiloglossa</i> sp.2	1	ARF	2-phenylethanol	Aro	
Halictidae					
<i>Megalopta</i> sp.1	3	AM	Mix2	Mon-Aro-Ite-Nbc	2
	2	AM	Mix3	Mon-Aro-Ite-Nbc	2
<i>Megalopta cuprea</i> Friese	1	AM	Mix3	Mon-Aro-Ite-Nbc	2
<i>Megalopta piraha</i> Santos and Melo	1	AM	Mix4	Mon-Ses	2
<i>Megalopta aeineicollis</i> Friese	9	AM	Mix3	Mon-Aro-Ite-Nbc	2
	16	AM	Mix4	Mon-Ses	2
<i>Megalopta sodalis</i> (Vachal)	1	AM	Mix4	Mon-Ses	2
	5	ARF	2-phenylethanol	Aro	
	2	ARF	1-octanol	Ali	
<i>Megommation insigne</i> (Smith)	14	ARF	Mix1	Aro-Ali	1
	3	ARF	1-octanol	Ali	1
	16	ARF	2-phenylethanol	Aro	

Biomes ARF: Atlantic Rain Forest; AM: Amazon Forest. **Compound** Mix1: benzyl alcohol (29%), 2-phenylethanol (35%), hexanal (2%), 1-hexanol (13%), (Z)-3-hexen-1-ol (8%), and 1-octanol (13%); Mix2: (*E*)- β -ocimene (4%), (*Z/E*)-linalool oxide furanoid (5%), methyl benzoate (17%), linalool (64%), epoxy-oxoisophorone (5%), phenylacetonitrile (2%), 4-oxoisophorone (2%), and (*Z/E*)-linalool oxide pyranoid (0.4%); Mix3: (*Z/E*)-linalool oxide furanoid (6%), methyl benzoate (19%), linalool (71%), phenylacetonitrile (2%), 4-oxoisophorone (2%), and (*Z/E*)-linalool oxide pyranoid (0.4%); Mix4: (*E*)- β -ocimene (57%), (*Z/E*)-linalool oxide furanoid (6%), linalool (30%), and (*E*)- β -caryophyllene (7%). **Chemical classes:** Ali= Aliphatic; Aro= Aromatic; Aro-Ali= Aromatic and Aliphatic; Mon-Ses= Monoterpenes and Sesquiterpenoids; Mon-Aro-Ite-Nbc= Monoterpenes, Aromatic, Irregular terpenes and Nitrogen bearing. **References** 1= Cordeiro et al. (2017); 2= Krug et al. (2018).

Table 2. Records of crepuscular and nocturnal bee species lured with volatile organic compounds and collected with passive method. All the specimens collected are female.

Bees - Family/Species	Number of individuals	Biome	Compounds	Class of compound	Refer.
Colletidae					
<i>Ptiloglossa cf. aenigmatica</i>	1	DF	Methyl salicylate	Aro	3
	1	DF	Vanillin	Aro	3
Halictidae					
<i>Megalopta aegis</i> (Vachal)	1	ARF	Eugenol	Aro	5
	4	ARF	Methyl salicylate	Aro	4
	2	ARF	Eucalyptol	Mon	5
	3	ARF	Benzyl acetate	Aro	5
	4	ARF	Benzyl benzoate	Aro	4
<i>Megalopta amoena</i> (Spinola)	238(233+5)	ARF	Eugenol	Aro	5, 3
	34 (11+18+5)	DAF	Methyl salicylate	Aro	3, 4, 5
	11	ARF	Eucalyptol	Mon	5
	13	ARF	Vanillin	Aro	5
	7 (1+6)	DAF	Benzyl acetate	Aro	4, 5
	4	DAF	Benzyl benzoate	Aro	4
<i>Megalopta guimaraesi</i> Santos and Silveira	1	DF	Benzyl benzoate	Aro	4
	196 (7+189)	DAF	Methyl salicylate	Aro	4, 5
	12 (4+8)	DAF	Benzyl acetate	Aro	4, 5
	1	DF	β -Ionone	Ite	4
	287	ARF	Eugenol	Aro	5
	139	ARF	Eucalyptol	Mon	5
	48	ARF	Vanillin	Aro	5
	3	ARF	Skatole	Nbc	5
<i>Megalopta sodalis</i> (Vachal)	1	DF	Eugenol	Aro	3
	1	DF	Methyl salicylate	Aro	3

Biomes ARF: Atlantic Rain Forest; AM: Amazon Forest; DF: Dry Forest; DAF: Dry forest and Atlantic Rain Forest. **Chemical classes:** Aro= Aromatic; It= Irregular terpenes; Mon= Monoterpenes; Nbc= Nitrogen bearing. **Reference** 3= Almeida et al (2020); 4= Carvalho et al. (2012); 5= Knoll and Santos (2012). Numbers in parentheses refer to the value in each Reference (last column).

DISCUSSION

The results demonstrate that chemical compounds are efficient to sample nocturnal bees, and sampling of bees attracted by volatile organic compounds should be incorporated as an additional method to apifauna surveys. It is worthy to offer compounds identified in plants that serve as host for nocturnal bees and use them individually or as blends.

The capture of nocturnal bees has usually been done with black and fluorescent light traps. Chandler (1961) collected 392 individuals of *Sphecodogastra texana* in LaPorte Indiana between 1959 and 1960. However, according to the author there is a possible interference by the killing agent cyanide in the attraction of the bees. Likewise, Woldan and Roubik (1986) collected an amazing number of two *Megalopta* species on the island of Barro Colorado, in Panama along seven years: 7,713 individuals of *M. ecuadoria* and 2,487 of *M. genalis*. One possible reason that explains the high abundance of these two species of *Megalopta* to light traps on the island of Barro Colorado was the synchronization with the flowering of the *Tachigalia versicolor* where the light trap was installed (Woldan and Roubik, 1986). The floral volatiles emitted by this plant may have helped attracting the bees to the light trap. Another explanation is the high abundance of nests of these two species on the island mentioned by Roulston (1997) and reiterated by Wcislo et al. (2004), which might have been close to the light traps. In Central America nine species of *Megalopta* are known (Gonzalez et al., 2010).

Floral synthetic compounds seem to attract more female than male nocturnal bees (Table 1 and 2). This differs with the sex of individuals attracted in the Euglossini tribe. Nemésio (2012) mentioned that attracting males in this tribe has led to taxonomic problems that involve describing species based on male specimens and making it difficult to match males with females. This situation is similar in the nocturnal bees, especially of the genus *Ptiloglossa*, where the taxonomic identification keys were constructed only for male specimens (Moure, 1945). However, the increase in female nocturnal bees in collections, e.g., by using chemical attractants, allows the construction of taxonomic keys that include male and female specimens, as done by Velez-Ruiz (2015).

Our study suggests that chemical compounds sample a higher diversity of species than light traps. Overall 14 species of 3 genera (*Megalopta*, *Megommation*,

Ptiloglossa) were collected on chemical lures so far, while the surveys conducted with light traps recorded five species, most of them belonging to the genus *Megalopta* (Chandler, 1961; Kerfoot, 1967; Wolda and Roubik, 1986; Roulston, 1997). Although the sample design made with the light traps is not comparable, in terms of time, area, climatic conditions, etc, the superiority in number of species by the chemical method suggests higher effectiveness in number of species.

The efficiency of chemical compounds according to the diversity and abundance of attracted nocturnal bees varied among the chemical classes. However, this may be due to the differences in the design and duration of the sampling carried out by each author in the literary review. Anyhow, most of the nocturnal bees were attracted to aromatic compounds, such as eugenol, methyl salicylate, 2-phenylethanol, and monoterpenes such as eucalyptol.

The aromatic compounds eugenol and methyl salicylate and the monoterpene eucalyptol, widely used for their efficiency in the attraction of male euglossine bees (Nemésio, 2012), lured 527, 236, and 152 individuals of nocturnal bees, respectively (Carvalho et al., 2012; Knoll and Santos, 2012; Almeida et al., 2020), mainly *Megalopta* spp., except for one individual a *Ptiloglossa* bee sampled with methyl salicylate (Almeida et al., 2020). The species most abundantly attracted to the abovementioned three compounds were *M. amoena* and *M. guimaraesi*. Although little is known about the abundance of these compounds in plants with nocturnal anthesis, they are present in a wide variety of plants with diurnal and nocturnal anthesis (El-Sayed, 2021; Knudsen et al., 2006).

Another aromatic worth mentioning is 2-phenylethanol. Unlike eugenol, methyl salicylate, and eucalyptol, 2-phenylethanol tends to be more generalistic and attracts more than one genus and family of nocturnal bees. In addition, this compound was efficient to attract also rare species such as *P. pretiosa* and *M. insigne*, in the latter of which also physiological responses to this compound were evidenced (electroantennography, Supplementary material). This general efficiency of 2-phenylethanol in attracting nocturnal bees may be due to their widespread occurrence among floral scents (Knudsen et al., 2006), sometimes also as major component of bee-pollinated plants (Dobson, 2006), among them plants with nocturnal anthesis (Shaver et al., 1997; Cordeiro et al., 2017; Cordeiro et al., 2019). 2-phenylethanol is also a known

attractant for solitary and social bees diurnal bees, among them the honeybee (Dötterl and Vereecken, 2010). In addition, though this compound is little used in male euglossine bee surveys, Rocha-Filho and Garófalo (2014) and own unpublished data suggest that it selectively attracts *Eufriesea surinamensis*.

Previous studies demonstrate that not only single compounds but also synthetic mixtures of compounds are capable of attracting nocturnal bee pollinators. Mixtures attracted 41 specimens of nocturnal bees of at least three genera and two families, including some *Megalopta* collected exclusively with these mixtures. Rare species such as *M. cuprea* and *M. piraha* were exclusively attracted to mixtures. Furthermore, unlike the individual compounds, these mixtures have the advantage of resembling the natural aroma emitted by the flowers and attracting potential pollinators (Cordeiro et al., 2017 and Krug et al., 2018).

Another important factor to discuss is the sampling methods with which the chemical compounds are offered to sample nocturnal bees. The passive sampling method that uses bottles and allows the chemical compound to be left overnight is very efficient to sample nocturnal bees, as well as Euglossini bees (Viana et al., 2002; Nemésio and Vasconcelos, 2013). By contrast, the active sampling method attracted smaller number compared to the passive method. However, with the active method, more species were collected. Furthermore, we want to highlight that with the active sampling it is possible to isolate the caught bees in single vials, which avoids pollen contamination. In other words, it allows future pollen analyses of each individual.

To conclude, our study shows that synthetic chemical compounds lure a wide diversity and abundance of nocturnal bees. Nocturnal bees' species are successfully attracted by aromatic compounds and monoterpenes such as eugenol, methyl salicylate, 2-phenylethanol and eucalyptol. Finally, offering volatile compounds in an active and passive way should be included in nocturnal apifauna surveys, as this approach attracts species otherwise difficult to obtain, and helps clarifying taxonomic issues and the dynamics of their populations of these important pollinators.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the financial agencies CNPq, Capes and Fapesp for supporting the projects. We also are grateful to the Ronaldo Pereira (Municipal Park Serra do Japi) for logistic support and the permission to work in the biological reserves. We are grateful to Antônio Rogerio dos Santos for generously allowing collections to be made in his own residence. Likewise, we thank Massuo Jorge Kato for allowing us to use the infrastructure of the LQPN - Laboratório de Química de Produtos Naturais, of the University of São Paulo, where the EAG tests were conducted and Laboratório de Biologia Comparada e Abelhas (LBCA), for the use its facilities for the identification of the collected specimens.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: CAMM, HOJM, IAS, RKOAC; Investigation, methodology and carried out collection of data: CAMM, CS, CK, ELF, GDC, HOJM, IAS, RKOAC, SD, SM. Electroantennographic assay: MAS; Writing, original draft preparation and review: CAMM, GDC, HOJM, IAS, MAS, PMP, RKOAC, SD; Revision by all authors; Supervision: IAS. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

FUNDING

This research was funded by CNPq (Grant No. PVE 401466/2014-0) to IAS, CS, SD; CNPq scholarships to HOJM, IAS, CS; CAPES scholarships to CAMM and RKC, CAPES PROEX; Fapesp (Grant No. 2014 / 50316–7) to MJK.

REFERENCES

Almeida, V. M. N., Franco, E. L., Carvalho, M. M., and Pereira, C.V. (2020). Atração de abelhas crepusculares e diurnas por iscas-odores em duas áreas distintas na Chapada

- Diamantina-Bahia. In A interface do conhecimento sobre abelhas 2, Org J.M Barbosa, L. Batista (Belo Horizonte, Atenas Editora), 18-33.
- Abbas, M., Ramzan, M., Hussain, N., Ghaffar, A., Hussain, K., Abbas, S., and Raza, A. (2019). Role of light traps in attracting, killing and biodiversity studies of insect pests in Thal. Pak. J. Agric. Sci. 32, 684-690.
- Berry, R. P., Wcislo, W. T., and Warrant, E. J. (2011). Ocellar adaptations for dim light vision in a nocturnal bee. J. Exp. Biol. 214, 1283-1293.
- Burgett, D. M., and Sukumalanand, P. (2000). Flight activity of *Xylocopa (Nyctomelitta) tranquebarica*: a night flying carpenter bee (Hymenoptera: Apidae). J. Apic. Res. 39, 75-83.
- Carvalho, A. T., Maia, A. C. D., Ojima, P. Y., dos Santos, A. A., and Schlindwein, C. (2012). Nocturnal bees are attracted by widespread floral scents. J. Chem. Ecol. 38, 315-318.
- Cordeiro, G. D., Pinheiro, M., Dötterl, S., and Alves-dos-Santos, I. (2017). Pollination of *Campomanesia phaea* (Myrtaceae) by night-active bees: a new nocturnal pollination system mediated by floral scent. Plant Biol. 19, 132-139. doi: 10.1111/plb.12520
- Cordeiro, G. D., dos Santos, I. G. F., da Silva, C. I., Schlindwein, C., Alves-dos-Santos, I., and Dötterl, S. (2019). Nocturnal floral scent profiles of Myrtaceae fruit crops. Phytochemistry 162, 193-198.
- Chandler, L. (1961). Light trap collections of the nocturnal bee, *Sphecodogastra texana* (Cresson) (Hymenoptera, Halictidae). In Proceedings of the Indiana Academy of Science, 71, 124-129.
- Danforth, B. N., Minckley, R. L., Neff, J. L., and Fawcett, F. (2019). The solitary bees: biology, evolution, conservation. Princeton University Press.
- Dobson, H. E. (2006). Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator. In Biology of floral scent, eds. N. Dudareva, E. Pichersky (Boca Raton, CRC Press/Taylor and Francis), 147-198.
- Dötterl, S., and Vereecken, N. J. (2010). The chemical ecology and evolution of bee–flower interactions: a review and perspectives. Can. J. Zool. 88, 668-697.
- Ferrari, R. R., Arantes, R. C., and Silveira, F. A. (2016). A new species of *Mydrosomella* Michener (Hymenoptera: Colletidae) from the semiarid caatinga domain, northeastern Brazil, with an identification key for the Species in the Genus. Ann. Zool. 66, 403-410.

- Franco, E. L., and Gimenes b, M. (2011). Pollination of *Cambessedesia wurdackii* in Brazilian campo rupestre vegetation, with special reference to crepuscular bees. J. Insect Sci. 11, 1-13.
- El-Sayed AM. (2021). The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. <<https://www.pherobase.com>>
- Gonçalves, R. B., and Santos, L. M. (2010). Notes and new species of the halictine genus *Megommation* Moure (Hymenoptera, Apidae, Augochlorini). Zootaxa, 2685, 57-64.
- Gonzalez, V. H., Griswold, T., and Ayala, R. (2010). Two new species of nocturnal bees of the genus *Megalopta* (Hymenoptera: Halictidae) with keys to species. Rev. Biol. Trop. 58, 255-263.
- Hopkins, M. J. G., Hopkins, H. F., and Sothers, C. A. (2000). Nocturnal pollination of *Parkia velutina* by *Megalopta* bees in Amazonia and its possible significance in the evolution of chiropterophily. J. Trop. Ecol. 5, 733-746.
- Kelber, A., Warrant, E. J., Pfaff, M., Wallén, R., Theobald, J. C., Wcislo, W. T., and Raguso, R. A. (2006). Light intensity limits foraging activity in nocturnal and crepuscular bees. Behav. Ecol. 17, 63-72.
- Kerfoot, W. B. (1967). The lunar periodicity of *Sphecodogastra texana*, a nocturnal bee (Hymenoptera: Halictidae). Anim. Behav. 15, 479-486.
- Knudsen, J. T., Eriksson, R., Gershenzon, J., and Ståhl, B. (2006). Diversity and distribution of floral scent. Bot. Rev. 72, 1–120.
- Krug, C., Garcia, M. V. B., and Gomes, F. B. (2015). A scientific note on new insights in the pollination of guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). Apidologie 46, 164-166.
- Krug, C., Cordeiro, G. D., Schäffler, I., Silva, C. I., Oliveira, R., Schlindwein, C., and Alves-dos-Santos, I. (2018). Nocturnal bee pollinators are attracted to guarana flowers by their scents. Front. Plant Sci. 1072, 1-6.
- Knoll, F., and Santos, L. M. (2012). Orchid bee baits attracting bees of the genus *Megalopta* (Hymenoptera, Halictidae) in Bauru region, São Paulo, Brazil: abundance, seasonality, and the importance of odors for dim-light bees. Rev. Bras. Entomol. 56, 481-488.
- Liporoni, R., Cordeiro, G.D., Prado, P.I., Schlindwein, C., Warrant, E. J., and Alves-dos-Santos, I. (2020). Light intensity regulates flower visitation in Neotropical nocturnal bees. Sci. Rep. 10, 1-11. doi:10.1038/s41598-020-72047-x

- Moure, J. S. (1945). Contribuição para o conhecimento dos Diphaglossinae, particularmente *Ptiloglossa* (Hym. - Apoidea). Arq. Mus. Paranaense. 4, 137-178.
- Moure, J. S. (1964). As espécies de *Zikanapis*, com a descrição de dois novos subgêneros e duas espécies novas (Hym. Apoidea). Stud. Ent. 7 (1-4), 417-458.
- Nemésio, A. (2012). Methodological concerns and challenges in ecological studies with orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossina). Biosci. J. 28, 118-135.
- Nemésio, A., and Vasconcelos, H. L. (2013). Beta diversity of orchid bees in a tropical biodiversity hotspot. Biodivers. Conserv. 22, 1647-1661.
- Nowinszky, L., and Puskás, J. (2017). Light-trap catch of insects in connection with environmental factors. In V.D.C Shields (Ed.), Biological Control of Pest and Vector Insects (pp. 97-118). Croatia, Rijeka: Editorial BoD – Books on Demand.
- Price, B., and Baker, E. (2016) NightLife: A cheap, robust, LED based light trap for collecting aquatic insects in remote areas. Biodivers. Data J. 4, e7648. doi: 10.3897/BDJ.4.e7648
- Rocha-Filho, L. C., and Garófalo, C. A. (2014). Phenological patterns and preferences for aromatic compounds by male euglossine bees (Hymenoptera, Apidae) in two coastal ecosystems of the Brazilian Atlantic Forest. Neotrop. Entomol. 43, 9-20.
- Roulston, T. A. H. (1997). Hourly capture of two species of *Megalopta* (Hymenoptera: Apoidea; Halictidae) at black lights in Panama with notes on nocturnal foraging by bees. J. Kans. Entomol. Soc. 70, 189-196.
- Santos, L. M., and Melo, G. A. R. (2015). Updating the taxonomy of the bee genus *Megalopta* (Hymenoptera: Apidae, Augochlorini) including revision of the Brazilian species. J. Nat. Hist. 49, 575-674.
- Santos, L. M., and Silveira, F. A. (2009). Taxonomic notes on *Megalopta* Smith, 1853 (Hymenoptera: Halictidae: Augochlorini) with a synopsis of the species in the state of Minas Gerais, Brazil. Zootaxa 2194, 1-20.
- Soares, N. C., & Morellato, L. P. C. (2018). Crepuscular pollination and reproductive ecology of *Trembleya laniflora* (Melastomataceae), an endemic species in mountain rupestrian grasslands. Flora 238, 138-147.
- Somanathan, H., and Borges, R. M. (2001). Nocturnal Pollination by the Carpenter Bee *Xylocopa tenuiscapa* (Apidae) and the Effect of Floral Display on Fruit Set of *Heterophragma quadriloculare* (Bignoniaceae) in India 1. Biotropica 33, 78-89.

- Somanathan, H., Borges, R. M., Warrant, E. J. and Kelber, A. (2008). Visual ecology of Indian carpenter bees I: Light intensities and flight activity. *J. Comp. Physiol. A* 194, 97–107.
- Shaver, T. N., Lingren, P. D., and Marshall, H. F. (1997). Nighttime Variation in Volatile Content of Flowers of the Night Blooming Plant *Gaura drummondii*. *J. Chem. Ecol.* 23, 2673-2682.
- Velez-Ruiz, R. I. (2015). A Revision of the Bee Genus *Ptiloglossa* Smith (Hymenoptera: Colletidae: Diphaglossinae). [dissertation/doctoral thesis]. [Brookings (SD)]: South Dakota State University
- Viana, B. F., Kleinert, A. M. P., and Neves, E. L. D. (2002). Comunidade de Euglossini (Hymenoptera, Apidae) das dunas litorâneas do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil. *Ver. Bras. Entomol.* 46, 539-545.
- Warrant, E. J., Kelber, A., Wallén, R., and Wcislo, W. T. (2006). Ocellar optics in nocturnal and diurnal bees and wasps. *Arthropod Struct. Dev.* 35, 293-305.
- Warrant, E. J. (2007). Nocturnal bees. *Curr. Biol.* 17, R991–R992.
- Wolda, H., and Roubik, D. W. (1986). Nocturnal bee abundance and seasonal bee activity in a Panamanian forest. *Ecology* 67, 426-433.
- Wcislo, W. T., Arneson, L., Roesch, K., Gonzalez, V., Smith, A., and Fernández, H. (2004). The evolution of nocturnal behaviour in sweat bees, *Megalopta genalis* and *M. ecuadoria* (Hymenoptera: Halictidae): an escape from competitors and enemies? *Biol. J. Linn. Soc.* 83, 377-3.

Supplementary Table 1. Location of the areas where the nocturnal bees were sampled in Brazil using chemical compounds. The number in parenthesis on the locality assigns to the reference. References: 1= Cordeiro *et al.* (2017); 2= Krug *et al.* (2018); 3= Almeida *et al.* (2020); 4= Carvalho *et al.* (2012); 5= Knoll and Santos (2012).

Locality	State	Data	Coordinates
Field station Embrapa-Manaus (2)	AM	Oct 2014	2°53' S, 59°58' W
Field station Embrapa Maués (2)	AM	Oct 2014	3°23' S, 57°40' W
Camargibe (4)	PE	March-Jul 2010	8°02' S, 34°59' W
Jacobina (3)	BA	May-Jun 2019	11° 20' S, 40° 29' W
Municipal Park Mucugê (3)	BA	May-Dec 2018	12°59'-13°00' S, 41°19'- 41°21' W
Alto Araguaia-Sta Rita do Araguaia (4)	MT- GO	Febr-March 2010	17°18' S, 53°12' W
The Ecological Station of Bauru (5)	SP	1993-2000	22°07'-22°15' S, 49°04'- 49°05' W
University Campus / UNESP Bauru (5)	SP	1993-2000	22°21' S, 49°01' W
The Ecological Station of Caetetus (5)	SP	1993-2000	22°22'-22°27' S, 49°40'- 49°43' W
Reserve Duratex (5)	SP	1993-2000	22°29'-22°47' S, 48°51'- 48°99' W
Municipal Reserve Serra do Japi	SP	Oct 2019-Jan 2020	23°14' S, 46°58' W
Osasco	SP	Jul-Sept 2019	23°28' S, 46°46' W
Neblinas Park (1)	SP	Sept 2011-Dec 2014/2020	23°44' S, 46°09' W
Mogi das Cruzes (1)	SP	Sept 2011-Dec 2014	23°25' S, 46°100' W

Supplementary Figure 1. Diagram of the active (**A**) and passive (**B**) method used to collect crepuscular and nocturnal bees with chemical compounds. We recommend the application of about 1 ml chemical compounds to filter paper or a cotton ball, which will be disposal directly on the plant branch or inside the trap bottle.

Supplementary material: Electroantennographic assays (EAG)

To evaluate the antennal responses of the nocturnal bee *Megommation insigne*, electroantennographic assays (EAG) were performed with 2-phenylethanol (10-3 diluted in acetone) and synthetic mixture resembling the night floral scent bouquet of *Campomanesia phaea*, which consisted of 1-hexanol (15%), 1-octanol (14%), benzyl alcohol (33%), and 2-phenylethanol (38%) (10-1 diluted in acetone). The analyses were performed with two specimens (one antenna per individual). The tip of the antenna was cut and inserted between two glass electrodes filled with insect Ringer solution (8.0 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.4 g/L CaCl₂). The electrodes were connected using silver wires to a signal amplifier connected to the acquisition controller (IDAC-02, USB, Syntech, The Netherlands). The mounted antenna was placed under a glass pipe with a stream of purified and humidified air (1 L/min).

The scent components (2-phenylethanol and *Campomanesia phaea* mixture) were injected into a humidified stream of air blown over the mounted antenna. For this, we applied 10 µL of the scent components to a strip of filter paper that was placed inside a glass Pasteur pipette. The Pasteur pipette was then introduced via a hole into the glass tube, and the solution inside the pipette was blown into the stream of air using a 0.7 s pulse of air applied by the CS-55 Stimulus Controller (Syntech, The Netherlands). An equal volume of pure acetone was used as a solvent control. The antennal responses to the different stimuli were recorded using the GC-EAD 2014 software (Syntech, The Netherlands). The scent component that elicited a depolarization response in at least one antenna was considered potentially active compounds.

Supplementary Figure 2. Electro-antennographic responses of *Megommation insigne* (n= 2); **A**= Individual 1, **B**= Individual 2; The top line shows the moment the 0.7 s stimulus was applied by the stimulus controller (flat top peaks) and the simultaneous electro-antennographic recording below (EAD, 0.5 mV). **a**= Acetone (control), **c**= Synthetic scent mixture of *Campomanesia phaea* floral bouquet (1-hexanol, 1-octanol, benzyl alcohol, 2-phenylethanol, 10-1 dilution in acetone, 10 μ L), **p**= 2-phenylethanol (10-3 dilution in acetone, 10 μ L).

APÊNDICE A – Informação detalhada de coleta das abelhas diurnas e noturnas

Tabela S1. Dados de coleta das abelhas diurnas e noturnas. Todas as abelhas coletadas são fêmeas.

Espécie	Localidade	Data	Método de coleta	N	Hora	Coletor
<i>Ptiloglossa latecalcarata</i> Moure	Osasco, SP	12-Jul-2019	2-phenylethanol	10	05:30 – 06:07	Martínez, C.
<i>Ptiloglossa latecalcarata</i> Moure	Osasco, SP	27-Jul-2019	2-phenylethanol	05	05:38 – 06:01	Martínez, C.
<i>Megommation insigne</i> (Smith)	Serra do Japi, Jundiaí, SP	15-17-Dez-2019	2-phenylethanol, 1-octanol	05	04:48 – 05:09	Ovidio, H
<i>Megommation insigne</i> (Smith)	Parque das Neblinas, SP	03-Dez-2020	2-phenylethanol	07	04:42 – 05:21	Martínez, C
<i>Zikanapis zikani</i> Moure	P.Est. Campos do Jordão, SP	18-19-Fev-2020	Puçá	03	05:55 -06:13	Martínez, C
<i>Apis mellifera</i> Linnaeus	P.Est. Campos do Jordão, SP	19-20-Fev-20	Puçá	05	10:32 – 11:24	Martínez, C.

APÊNDICE B – Informação detalhada das abelhas diurna e noturnas de coleções biológicas

Tabela S2. Dados de coleta de abelhas diurnas e noturnas da coleção biológica CEPANN e da coleção Prof. J.M.F. Camargo. Mix 1= benzyl alcohol, 2-phenylethanol, hexanol, 1-hexanol, (Z)-3-hexen-1-ol, e 1-octanol. CEPANN= *Megommation insigne*, *Zikanapis seabrai*, *Augochloropsis cognata*, *Centris nitens*, *Bombus brasiliensis*. Prof. J.M.F. Camargo= *Megalopta amoena*, *Megalopta aegis*.

Espécie	Localidade	Data	Método de coleta	N	Coletor	Código
<i>Megalopta amoena</i> (Spinola)	Nova xavantina, MT	31-Fev-1997	Armadilha de luz	01	Barreira, R. C	128
<i>Megalopta amoena</i> (Spinola)	Nova xavantina, MT	31-Mai-1997	Armadilha de luz	01	Barreira, R. C	131
<i>Megalopta amoena</i> (Spinola)	Nova xavantina, MT	28-Nov-1997	Armadilha de luz	02	Barreira, R. C	122, 125
<i>Megalopta amoena</i> (Spinola)	Nova xavantina, MT	20-24-Jan-1998	Armadilha de luz	03	Barreira, R. C	110, 111, 112
<i>Megalopta amoena</i> (Spinola)	Nova xavantina, MT	29-Abr-1998	Armadilha de luz	01	Cobette, H	107
<i>Megalopta amoena</i> (Spinola)	Nova xavantina, MT	26-31-Jun-1998	Armadilha de luz	02	Barreira, R. C	109, 126
<i>Megalopta amoena</i> (Spinola)	Nova xavantina, MT	19-Sep-1998	Armadilha de luz	02	Barreira, R. C	118, 119
<i>Megalopta amoena</i> (Spinola)	Nova xavantina, MT	19-Nov-1998	Armadilha de luz	02	Barreira, R. C	106, 116
<i>Megalopta amoena</i> (Spinola)	Nova xavantina, MT	29-Nov-1998	Armadilha de luz	01	Cobette, H	108
<i>Megalopta aegis</i> (Vachal)	Nova xavantina, MT	20-Jan-1998	Armadilha de luz	03	Barreira, R. C	55, 51, 50
<i>Megalopta aegis</i> (Vachal)	Nova xavantina, MT	24-Abr-1998	Armadilha de luz	01	Barreira, R. C	33
<i>Megalopta aegis</i> (Vachal)	Nova xavantina, MT	19-22-Nov-1998	Armadilha de luz	10	Barreira, R. C	49, 47, 46, 44, 53, 45, 52, 42, 56, 58
<i>Megalopta aegis</i> (Vachal)	Nova xavantina, MT	25-Nov-1997	Armadilha de luz	01	Barreira, R. C	59
<i>Megommation insigne</i> (Smith)	Mogi das Cruzes, SP	Out-2011	Mix 1	03	Cordeiro, G	-
<i>Zikanapis seabrai</i> Moure	Parque das Neblinas, SP	Nov-2012	Puçá, em flor	04	Cordeiro, G	-
<i>Augochloropsis cognata</i> Moure	Res. do Morro Grande, SP	Fev-1997	Puçá	08	Aguilar & Matos	12550, 560, 561, 562, 563, 598, 616, 623
<i>Augochloropsis cognata</i> Moure	Res. do Morro Grande, SP	Mar-1997	Puçá	05	Aguilar & Matos	12713, 786, 821, 832, 697
<i>Augochloropsis cognata</i> Moure	Res. do Morro Grande, SP	Abr-1997	Puçá	02	Aguilar & Matos	13069, 8409
<i>Bombus brasiliensis</i> Lepeletier	Res. do Morro Grande, SP	Dez-1996	Puçá	02	Aguilar & Matos	12165, 393
<i>Bombus brasiliensis</i> Lepeletier	Res. do Morro Grande, SP	Dez-1997	Puçá	10	Aguilar & Matos	12594, 595, 596, 678, 689, 817, 840, 864, 874, 953
<i>Bombus brasiliensis</i> Lepeletier	Res. do Morro Grande, SP	-	Puçá	03	Aguilar & Matos	-
<i>Centris nitens</i> Lepeletier	Res. do Morro Grande, SP	-	Puçá	15	Aguilar & Matos	-

APÊNDICE C – Diferenças estatísticas entre as abelhas noturnas e diurnas baseadas nas medidas analisadas

Tabela S3. P-valores das comparações do comprimento de cada segmento da antena entre as abelhas noturnas e sua correspondente diurna. **a**= Diferença estatística significativa ($P \leq 0,01$), **b**= Diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$).

Espécies noturnas	Escapo	Pedicelo	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀	Espécies diurnas
<i>M. aegis</i>	1.142e-13a	6.993e-10a	9.148e-08a	6.104e-05a	8.692e-13a	1.862e-12a	1.424e-12a	9.469e-13a	3.754e-15a	9.363e-13a	1.117e-13a	2.319e-07a	
<i>M. amoena</i>	1.57e-07a	1.45e-06a	6.058e-07a	7.229e-04a	1.651e-11a	4.118e-11a	1.681e-10a	5.478e-09a	6.856e-09a	1.273e-07a	1.346e-04a	0.7651	<i>A. cognata</i>
<i>M. insigne</i>	6.104e-05a	3.21e-09a	2.244e-12a	6.104e-05a	3.643e-09a	2.262e-09a	2.329e-12a	7.963e-11a	6.523e-12a	7.55e-11a	5.341e-08a	1.028e-04a	
<i>P. latecalcarata</i>	5.905e-12a	6.587e-08a	1.363e-04a	0.04669b	3.243e-07a	0.07822	1.915e-03	1.917e-05a	4.447e-07a	1.035e-07a	2.231e-07a	8.963e-08a	
<i>Z. seabrai</i>	2.221e-03b	0.02236b	0.03839b	0.625	0.1159	0.01107b	0.6451	0.07667	0.02022b	0.03663b	0.09946	0.375	<i>C. nitens</i>
<i>Z. zikani</i>	0.00732a	3.492e-03a	0.02972b	0.25	0.7882	0.02856b	0.06457	0.03554b	0.0996	0.3151	0.05175	0.8448	
<i>P. latecalcarata</i>	5.022e-12a	0.08143	4.714e-14a	7.223e-10a	1.062e-08a	0.01025b	0.02155b	0.1223	0.3271	0.03735b	0.00117a	1.199e-10a	
<i>Z. seabrai</i>	0.001428a	0.0401b	1.914e-04a	0.00905a	0.00738a	0.125	0.125	0.01889b	0.0937	0.2365	0.1418	0.25	<i>B. brasiliensis</i>
<i>Z. zikani</i>	0.00782a	9.221e-04a	0.006571a	0.01422b	0.01779b	0.25	0.75	0.2189	0.5517	0.2259	0.9715	0.8796	
<i>M. aegis</i>	9.54e-11a	1.361e-04a	0.06124	5.838e-07a	0.1404	0.5922	1.698e-04a	5.53e-08a	9.286e-08a	2.487e-06a	3.603e-05a	2.246e-08a	
<i>M. amoena</i>	0.4042	0.1837	0.3122	0.001685a	2.646e-06a	2.534e-05a	0.04342b	0.2981	0.4169	0.07093	0.02056b	0.1687	
<i>M. insigne</i>	6.104e-05a	2.094e-06a	1.95e-11a	1.851e-07a	3.385e-08a	7.915e-05a	0.5279	3.129e-05a	2.652e-05a	0.001022a	0.6661	0.001067a	
<i>P. latecalcarata</i>	9.687e-07a	0.001351a	2.2e-16a	1.12e-09a	0.008217a	6.764e-07a	5.325e-10a	1.064e-10a	3.152e-11a	1.613e-12a	6.86e-11a	5.343e-14a	<i>A. mellifera</i>
<i>Z. seabrai</i>	0.006516a	0.6026	1.616e-05a	0.01756b	0.05032	0.005212a	0.003213a	3.078e-04a	2.118e-04a	0.001154a	1.852e-04a	0.125	
<i>Z. zikani</i>	0.4327	0.1341	0.001891a	0.03003b	0.002182a	0.0038a	0.01257b	0.007016a	0.01291b	7.804e-04a	0.04298b	0.05857	

Tabela S4. P-valores das comparações do diâmetro do flagelo entre as abelhas noturnas e sua correspondente diurna. **a**= Diferença estatística significativa ($P \leq 0,01$), **b**= Diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$).

Espécies noturnas	F ₁ -Inf	F ₁ -Sup	f ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀	Espécies diurnas
<i>M. aegis</i>	8.863e-10a	9.018e-11a	5.594e-11a	1.48e-10a	3.52e-10a	7.225e-11a	2.117e-10a	2.993e-11a	2.377e-09a	1.053e-09a	1.144e-10a	
<i>M. amoena</i>	6.71e-07a	1.016e-08a	3.34e-08a	8.161e-08a	1.437e-07a	2.712e-07a	3.746e-06a	1.356e-05a	0.001094a	3.717e-05a	8.569e-06a	<i>A. cognata</i>
<i>M. insigne</i>	3.979e-07a	4.47e-09a	8.114e-10a	8.367e-10a	2.959e-08a	8.475e-08a	3.907e-08a	2.231e-09a	1.716e-07a	1.297e-07a	5.493e-09a	
<i>P. latecalcarata</i>	1.878e-10a	5.716e-09a	0.004121a	4.198e-08a	6.104e-05a	1.728e-09a	1.253e-08a	2.022e-09a	7.247e-04a	8.087e-09a	7.247e-04a	
<i>Z. seabrai</i>	0.001981b	0.05614	0.8828	0.5914	0.07198	0.03896b	0.03208b	0.01811b	0.125	0.3177	0.125	<i>C. nitens</i>
<i>Z. zikani</i>	0.1176	0.03817b	0.04935	0.004276a	0.00101a	0.01426b	0.01676b	0.00608	0.1736	0.02141b	0.25	
<i>P. latecalcarata</i>	3.254e-07a	3.558e-06a	0.005856a	3.479e-09a	7.229e-04a	2.222e-07a	2.434e-08a	9.316e-08a	2.534e-08a	7.46e-07a	7.12e-07a	
<i>Z. seabrai</i>	0.3979	0.2688	0.48	0.5479	0.5104	0.3033	0.07527	0.08548	0.3169	0.7734	0.5848	<i>B. brasiliensis</i>
<i>Z. zikani</i>	0.238	0.06867	0.05588	0.003545a	0.01299b	0.03881b	0.06301	0.06234	0.05325	0.07662	0.03785b	
<i>M. aegis</i>	8.873e-10a	2.683e-09a	5.438e-10a	4.89e-14a	2.11e-13a	3.408e-13a	3.407e-14a	5.713e-14a	1.498e-12a	2.074e-12a	6.104e-05a	
<i>M. amoena</i>	5.788e-07a	6.14e-07a	5.161e-09a	6.655e-09a	1.483e-09a	9.881e-13a	3.144e-11a	1.543e-11a	7.193e-04a	3.088e-09a	7.247e-04a	
<i>M. insigne</i>	6.764e-09a	3.179e-07a	1.432e-11a	1.14e-11a	3.793e-10a	8.003e-10a	3.377e-11a	1.022e-12a	3.118e-12a	8.942e-12a	7.229e-04a	
<i>P. latecalcarata</i>	9.379e-14a	2.2e-16a	7.229e-04a	2.2e-16a	7.158e-04a	4.481e-16a	6.215e-15a	2.565e-15a	3.391e-15a	8.997e-15a	6.104e-05a	<i>A. mellifera</i>
<i>Z. seabrai</i>	1.258e-04a	4.72e-04a	1.129e-04a	2.901e-04a	6.37e-05a	2.574e-04a	1.8e-04a	1.064e-04a	2.38e-04a	7.088e-04a	0.125	
<i>Z. zikani</i>	0.04784b	0.001022a	0.002188a	3.987e-05a	2.977e-04a	9.153e-04a	0.001002a	5.853e-04a	5.597e-04a	0.004884a	0.25	

Tabela S5. P-valores das comparações da área do flagelo entre as abelhas noturnas e sua correspondente diurna. **a**= Diferença estatística significativa ($P \leq 0,01$), **b**= Diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$).

Espécies noturnas	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀	Espécies diurnas
<i>M. aegis</i>	1.165e-09a	1.331e-11a	7.327e-12a	1.187e-11a	5.359e-12a	1.714e-14a	2.039e-12a	2.139e-12a	4.996e-11a	<i>A. cognata</i>
<i>M. amoena</i>	3.4e-09a	6.104e-05a	7.26e-11a	3.501e-10a	8.024e-09a	1.934e-09a	6.104e-05a	6.104e-05a	0.005833a	
<i>M. insigne</i>	3.982e-10a	2.763e-10a	8.624e-10a	2.841e-13a	4.002e-11a	1.223e-12a	7.972e-12a	2.946e-10a	8.703e-08a	
<i>P. latecalcarata</i>	0.06909	0.06032	1.746e-05a	4.26e-08a	1.319e-07a	7.247e-04a	7.118e-10a	1.95e-11a	2.881e-10a	<i>C. nitens</i>
<i>Z. seabrai</i>	0.8691	0.05998	0.0796	0.3228	0.02296b	0.125	0.08128	0.01573b	0.125	
<i>Z. zikani</i>	0.08396	0.08918	0.005089a	0.01332b	0.00175a	0.25	0.07708	0.03612b	0.1479	
<i>P. latecalcarata</i>	0.001329a	9.03e-04a	0.07296	0.008602a	0.002225a	0.001145a	1.453e-06a	2.312e-06a	8.882e-11a	<i>B. brasiliensis</i>
<i>Z. seabrai</i>	0.02914b	0.01617b	0.05629	0.07008	0.1899	0.6519	0.7069	0.4165	0.125	
<i>Z. zikani</i>	0.087	0.2125	0.04481b	0.0754	0.4021	0.5214	0.5878	0.4508	0.1641	
<i>M. aegis</i>	2.685e-08a	4.45e-06a	1.527e-08a	7.799e-09a	2.217e-11a	9.365e-11a	2.192e-10a	4.332e-10a	6.856e-11a	<i>A. mellifera</i>
<i>M. amoena</i>	3.765e-07a	0.8904	0.001455a	9.192e-07a	2.887e-07a	8.236e-08a	8.898e-04a	0.00286a	3.119e-05a	
<i>M. insigne</i>	5.411e-09a	0.9522	0.01398b	7.26e-09a	1.731e-09a	1.943e-10a	9.892e-10a	5.96e-08a	1.224e-08a	
<i>P. latecalcarata</i>	7.247e-04a	9.364e-14a	2.724e-12a	3.259e-14a	1.28e-13a	1.118e-13a	6.117e-16a	9.911e-15a	1.325e-14a	
<i>Z. seabrai</i>	0.002308a	0.001538a	3.321e-05a	8.773e-05a	1.157e-04a	4.103e-05a	1.347e-04a	3.58e-04a	0.125	
<i>Z. zikani</i>	0.004859a	3.881e-04a	2.077e-04a	9.221e-04a	0.002083a	0.00492a	0.003721a	0.01316b	0.007612a	