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

“Fenologia reprodutiva, polinização e voláteis florais do cambuci
(*Campomanesia phaea* (O.Berg) Landrum 1984 - Myrtaceae)”.

Guaraci Duran Cordeiro

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2015

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

“Fenologia reprodutiva, polinização e voláteis florais do cambuci
(*Campomanesia phaea* – Myrtaceae)”.

“versão corrigida”

Guaraci Duran Cordeiro

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Alves dos Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Mardiore Pinheiro

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2015

Dedico este trabalho a minha esposa Fernanda

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos:

À minha esposa Fernanda, para quem eu dedico este trabalho, por todo apoio, amor, companheirismo e paciência. Mesmo nos momentos de ausência, que foram difíceis, estivemos fortes para um dia alcançarmos os nossos sonhos;

Aos meus pais, por serem meus maiores incentivadores, pelo carinho e pelo total apoio. Vocês são o modelo de vida que eu sigo, eu quero um dia conseguir ter um pouco da sabedoria, honestidade, solidariedade e humildade de vocês. Quero agradecer novamente ao meu pai, por ter me ajudado muito nas coletas de campo;

À Professora Isabel Alves dos Santos por todo o incentivo, apoio, aprendizado e amizade. A “Isa” abriu para mim as portas do mestrado e doutorado e sempre me mostrou e incentivou para buscar os voos mais altos. Ter convivido com a Isa durante os últimos 7 anos, me fez aprender muito mais que as lições no mundo científico, me tornou uma pessoa melhor;

À Professora Mardiore Pinheiro pelo incentivo, aprendizado e sugestões. Agradeço muito a nossa parceria e amizade firmada no projeto dos Polinizadores do Brasil e que ainda se mantém;

Aos proprietários dos sítios da Família Nagai e Alexandre pela confiança em me receber em suas casas e pela amizade;

Aos amigos do Laboratório de Abelhas, pela constante ajuda, sugestões, discussões, parcerias, paciência e principalmente pela grande amizade em todos os momentos;

Ao Paulo César “PC”, técnico do Laboratório de Abelhas, que me ajudou muito nas tarefas de laboratório, nas coletas de campo, nas fotos, etc. Agradeço muito por ter o “PC” como parceiro desde o mestrado;

Aos amigos da Filô (FFCLRP) pelas sugestões e parceria nas horas de estudo;

Aos amigos Rafael Takashi e Priscila Bittar pela ajuda no laboratório e nas coletas de campo;

Aos professores da Pós-graduação que lecionaram ótimas disciplinas, em especial Emerson Pansarin, Marlies Sazima e Klaus Lunau;

Ao Prof. Stefan Dötterl pelo total suporte no meu período na Universidade de Salzburg (Áustria) e pelos enormes ensinamentos;

À Irmgard Schäffler por ter me ajudado muito nos experimentos realizados na Universidade de Salzburg;

Ao Prof. Jim Cane da Universidade de Utah, por ter me recebido em seu laboratório, pela atenção e sugestões inovadoras ao meu trabalho;

À Professora Marlies Sazima e a técnica Iara Bressan da Universidade de Campinas pelo suporte nas amostras de microscopia de fluorescência;

À Dra. Claudia Inês pela atenção, pelo suporte nas amostras de pólen e sugestões ao meu trabalho;

À Elisa Queiros da Universidade de São Paulo pela ajuda no laboratório para o preparo das lâminas de pólen;

À Dra. Ludmila Pansarin da Universidade de São Paulo pelas sugestões na metodologia do meu trabalho;

À Professora Gladys Flavia da Universidade de São Paulo que me ajudou nas metodologias de biologia floral;

Ao Professor Marcelo Aizen pelas discussões e sugestões no meu trabalho;

Ao Instituto de Biociências e Laboratório de Abelhas por sempre ter me abrigado e por todo o suporte para realização da minha pesquisa;

À Secretaria de Pós-graduação de Entomologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, principalmente a Renata Andrade Cavallari pela competência, paciência e por sempre ter resolvido os meus problemas burocráticos;

Ao Instituto Ecofuturo - Parque das Neblinas pela concessão de local para estudo, apoio e pela amizade de todos. Em especial ao Guilherme Dias, Michele, Paulo Groke, guarda parques e monitores;

Aos especialistas pelas identificações dos espécimes: Antonio Aguiar, Danúncia Urban, Eduardo Almeida, Felipe Vivallo, Kelly Ramos, Leandro Santos, Leo Correia da Rocha, Mirian Morales, Rodolfo Arantes, Silvia Pedro e Terry Griswold;

Ao Fundo de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) por ter me concedido as bolsas de Doutorado (processo: 2011/06511-5) e estágio no exterior (2013/26599-6);

Ao Funbio e Ministério do Meio Ambiente pelo apoio financeiro durante minha estadia nos Estados Unidos durante o estágio com o Prof. Jim Cane.

ÍNDICE

RESUMO	8
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	12
Espécie estudada	18
Áreas de estudo	18
Referências Bibliográficas.....	21
CAPÍTULO 1 - Fenologia reprodutiva do cambuci (<i>Campomanesia phaea</i> (O.Berg) Landrum 1984 - Myrtaceae) em áreas de ocorrência natural e cultivo.	
Resumo	25
Introdução	25
Materiais e Métodos	26
Resultados	28
Discussão	33
Referências Bibliográficas.....	37
CAPÍTULO 2 - Biologia floral, sistema reprodutivo e polinização do cambuci (<i>Campomanesia phaea</i> - Myrtaceae).	
Resumo	43
Introdução.....	43
Materiais e Métodos	45
Resultados	48
Discussão	58
Referências Bibliográficas.....	63
CAPÍTULO 3 - Os voláteis florais de <i>Campomanesia phaea</i> (Myrtaceae) e seus efeitos no comportamento de seus polinizadores noturnos e crepusculares.	
Resumo	72
Introdução.....	72
Materiais e Métodos	74
Resultados	79
Discussão	83
Referências Bibliográficas.....	85

RESUMO

A família Myrtaceae tem muitas espécies frutíferas, algumas são utilizadas comercialmente, entre elas o cambuci (*Campomanesia phaea*). Os objetivos deste trabalho foram descrever a fenologia reprodutiva, a biologia floral, o sistema reprodutivo e identificar os polinizadores do cambuci para gerar novos conhecimentos que possam contribuir com a produtividade desta espécie. O estudo de fenologia reprodutiva foi conduzido por dois anos, em área de ocorrência natural e área de cultivo comercial. As fenofases (floração e frutificação) foram monitoradas com duas métricas: Índice de atividade (sincronia) e Índice de intensidade (intensidade - Fournier) e correlacionadas com fatores abióticos (temperatura, pluviosidade e comprimento do dia). Os resultados mostraram que a floração e frutificação na área de ocorrência natural e cultivo foram diferentes, mesmo sob mesmas condições climáticas. A floração e frutificação foram mais intensas e sincrônicas na área de cultivo. Os fatores abióticos não explicaram estas diferenças nas fenofases entre as áreas de estudo, porém a adubação do solo e diversidade de polinizadores tiveram papel importante. No estudo de polinização de *C. phaea* foram observados a duração de antese, recursos florais, receptividade do estigma e viabilidade polínica. O sistema reprodutivo de *C. phaea* foi investigado baseado na razão P:O e pelos experimentos de polinização manual. Os visitantes florais foram capturados e os polinizadores mais eficientes foram determinados, conforme número de pólen depositado no estigma e número de frutos produzidos. As flores de *C. phaea* duram dois dias, são hermafroditas e têm o pólen como o único recurso disponível para os visitantes florais. A antese é noturna e começa em torno das 5 h. O sistema reprodutivo de *C. phaea* é o autoincompatível. Foram coletadas 52 espécies de visitantes florais e entre elas as mais eficientes na polinização foram as abelhas noturnas e crepusculares (*Megalopta sodalis*, *Megommation insigne*, *Ptiloglossa latecalcarata* e *Zikanapis seabrai*). Além destas abelhas, as flores de *C. phaea* também foram visitadas e polinizadas por *Apis mellifera* nos períodos crepusculares e diurnos. Para entender como as abelhas noturnas/crepusculares encontram as flores do cambuci no escuro foram coletadas amostras dos voláteis florais (a noite e durante o dia), pelo método de *dynamic headspace* e posteriormente analisados por GC-MS. Experimentos eletroantenográficos (GC-EAD) e biotestes foram realizados para testar se os compostos identificados das flores do cambuci são capazes

de estimular respostas eletrofisiológicas e comportamentais nas abelhas noturnas/crepusculares. Foram encontrados 14 compostos voláteis nas flores de *C. phaea*, os mesmos nas amostras da noite e do dia, embora a composição relativa do odor tenha diferido entre os dois períodos. A emissão dos voláteis é maior a noite durante a atividade das abelhas noturnas/crepusculares, e alguns compostos são mais eminentes durante a noite (ex, 1-Octanol) e outros ao dia (ex, 2-Phenylethanol). As abelhas noturnas foram atraídas para os odores sintéticos da flor do cambuci. *Apis mellifera* também respondeu positivamente ao teste eletroantenográfico e biotestes. Os resultados mostraram que os voláteis emitidos a noite pelas flores de *C. phaea* tem função atrativa para as abelhas noturnas/crepusculares, e sugere que 1-Octanol possa ser o composto chave nesta atração.

ABSTRACT

The family Myrtaceae has many fruiting species, some are commercially explored. Among those species is the *cambuci* (*Campomanesia phaea*). The objectives this work were to describe the reproductive phenology, the floral biology, the reproductive system, and to identify the pollinators of *cambuci* in order to generate new knowledge that may help increase the productivity of this species. The study about reproductive phenology was conducted for two years, in an area of natural occurrence and in a commercial crop. The phenophases (flowering and fruit set) were monitored with Activity index (synchrony) and Intensity index (Fournier intensity) and correlated with abiotic factors (temperature, rainfall, and day length). The results showed that flowering and fruit set of *C. phaea* in natural area and crop were different even under same climatic conditions. The flowering and fruit set were more intense and synchrony in the crop. The abiotic factors do not explain these differences in the phenophases between the study areas, but other variables, such as soil fertilization and pollinator diversity, play an important role. In the pollination study of *C. phaea* were observed the anthesis duration, floral resources, stigma receptivity, and pollen viability. The reproductive system of *C. phaea* was investigated based on the P:O ratio and by carrying out manual pollination tests. The flower visitors were captured and determined the most efficient pollinators, according to effectiveness by number of pollen grains deposited in the stigma and number of fruit set. The flowers of *C. phaea* last two days, are hermaphrodite, and have pollen as the only resource offered to flower visitors. Its anthesis is nocturnal and begins around 5 h. The reproductive system of *C. phaea* is self-incompatible. Were collected 52 species of flower visitors and among them the most efficient in pollination were nocturnal and crepuscular bees (*Megalopta sodalis*, *Megommation insigne*, *Ptiloglossa latecalcarata* e *Zikanapis seabrai*). Besides these bees, the flowers of *C. phaea* flowers were also visited and pollinated by *Apis mellifera* in crepuscular and diurnal periods. In order to understand how the nocturnal/crepuscular bees find cambuci flowers in darkness flower volatiles were collected (at night and during the day) by dynamic headspace method and after analyzed by GC-MS. In addition, electroantennographic (GC-EAD) and behavioural experiments (bioassays) were performed to test if compounds identified from cambuci flowers are capable in eliciting electrophysiological and behavioural responses in nocturnal/crepuscular bees.

In total 14 volatiles compounds were found in *C. phaea* flowers, the same in the night and day samples. Although, the relative scent composition differed between these two periods. The volatile emission is higher during the activity of nocturnal/crepuscular bees, and some compounds are more eminent during the night (e.g., 1-Octanol) and some during the day (e.g., 2-Phenylethanol). The nocturnal/crepuscular were attracted by synthetic scent of the cambuci flowers. *Apis mellifera* also showed positive responds towards for electroantennographic and behavioural bioassays. The results showed that volatiles emitted at night by *C. phaea* flowers have attractive function to nocturnal/crepuscular bees, and suggest that 1-Octanol can be the key compound for this attraction.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Myrtaceae está organizada em duas subfamílias, Myrtoideae e Psiloxylloideae, que possuem ao menos 133 gêneros e em torno de 3800 espécies que ocorrem em todos os continentes. A maior diversidade de Myrtaceae ocorre na Austrália, Sudeste asiático e América do Sul (Johnson & Briggs 1984). A subfamília Myrtoideae inclui todas as mirtáceas das Américas e a tribo Myrteae inclui todas as mirtáceas brasileiras (Wilson *et al.* 2005), que reúnem 1013 espécies descritas (Sobral *et al.* 2015).

Os representantes de Myrtaceae são arbustos e árvores reconhecidos pela combinação dos seguintes fatores: folhas simples contendo glândulas de óleo; flores hermafroditas, brancas (raramente rosas, vermelhas ou roxas), ovário ínfero, 4-5 pétalas, estames numerosos; frutos carnosos, muitas sementes e cálice persistente (Landrum & Kawasaki 1997).

As mirtáceas brasileiras não produzem madeiras valiosas, pois geralmente possuem troncos finos (Marchiori & Sobral 1997). Por outro lado, o gênero *Eucalyptus* possui grande valor econômico pela utilização da madeira, mas é exótico no Brasil. O valor econômico das mirtáceas brasileiras provém das muitas espécies frutíferas (Figura 1). Os gêneros *Eugenia*, *Campomanesia*, *Psidium* e *Myrciaria* agrupam a maior parte das espécies de interesse econômico, que representam apenas uma pequena fração do grande potencial econômico da família, tendo em vista o número de frutos comestíveis não explorados comercialmente (Landrum & Kawasaki 1997).

O gênero *Campomanesia* é exclusivo da América do Sul e está representado por aproximadamente 25 espécies distribuídas do norte da Argentina a Trinidad Tobago (Landrum 1986). *Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum 1984, o cambuci, é endêmica do Brasil e ocorre nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Lorenzi *et al.* 2006). No Estado de São Paulo, o cambuci ocorre na vertente da Serra do Mar para o planalto paulista e no início do planalto em direção ao interior (Lorenzi 1992).

O nome popular “cambuci” é de origem indígena e provém da forma de seus frutos, parecidos com os potes de cerâmica indígenas que recebiam o mesmo nome. Suas árvores eram abundantes na cidade de São Paulo, tanto que no começo do século XX, no ano de 1906, deu nome a um bairro tradicional da cidade, o bairro do Cambuci.

Atualmente, devido ao desmatamento das suas áreas de ocorrência natural, o cambuci é considerado uma espécie vulnerável pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*).

O fruto do cambuci apresenta limitações ao consumo humano *in natura* devido ao baixo teor de carboidratos e elevada acidez (pH=2,91) que o torna pouco palatável. Porém, apresenta potencial para a industrialização justamente devido a esta acidez e a outras qualidades como razoáveis concentrações de ácido ascórbico, minerais e fibras alimentares, além do alto rendimento em polpa (Vallilo *et al.* 2005). Os frutos possuem interessantes propriedades aromáticas que os favorecem como agentes flavorizantes em alimentos e bebidas (Adati 2001). Estas características do cambuci fazem com que a fruta tenha um grande potencial econômico (Kawasaki & Landrum 1997), podendo ser utilizada na produção de doces caseiros, sorvetes, aguardente, licores e refrescos (Vallilo *et al.* 2005).

O comércio do cambuci ainda é incipiente no Brasil, tanto que não consta na lista do censo agropecuário do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). A comercialização ocorre apenas localmente nas cidades com maior tradição de produção da fruta. Como o consumo *in natura* é limitado, a fruta é usada para o beneficiamento de cosméticos, bebidas e doces (Figura 2).

No Estado de São Paulo ocorrem vários eventos tendo como tema principal a fruta do cambuci (Figura 2), como por exemplo, cursos de culinária, plantio de mudas e a comercialização da fruta *in natura* e dos produtos beneficiados. O maior evento é a “Rota Gastronômica do Cambuci”, que anualmente percorre diversas cidades do interior do Estado de São Paulo e finaliza no Mercado Municipal de São Paulo.

Fenologia é o estudo da periodicidade de eventos biológicos e das causas de sua ocorrência (Lieth 1974), sendo assim muito importantes para a compreensão da dinâmica das comunidades vegetais (Talora & Morellato 2000). Os eventos fenológicos (fenofases) das plantas envolvem brotação de folhas, floração, frutificação e germinação de sementes (Lieth 1974) e a periodicidade destes eventos é influenciada por fatores bióticos e abióticos (Van Schaik *et al.* 1993) que afetam profundamente as interações de plantas e animais e, conseqüentemente, a sobrevivência e sucesso reprodutivo destes (Elzinga *et al.* 2007).

Estudos fenológicos contribuem para o conhecimento da regeneração e reprodução das plantas, da organização temporal dos recursos dentro das comunidades e

consequentemente das interações planta-polinizador e planta-dispersor (Morellato & Leitão-Filho 1992). Gentry (1974) descreveu a fenologia de floração de espécies em florestas tropicais em termos de duração, frequência e amplitude, além disso, discutiu a significância ecológica de tais categorias em relação à polinização. Bencke & Morellato (2002) sugeriram a padronização e combinação de dois índices que analisam períodos de atividade e níveis de intensidade das fenofases, facilitando as análises do comportamento fenológico das plantas e das interações animal-plantas, como por exemplo, sincronia de floração e disponibilidade de flores para os polinizadores.

A polinização é um processo biológico de grande importância em todos os ecossistemas terrestres, onde agentes polinizadores são vetores dos grãos de pólen entre as flores e auxiliam na fertilização das plantas e, consequentemente, na formação dos frutos e sementes. Assim, os polinizadores atuam na manutenção das populações vegetais em ambientes naturais, favorecendo o fluxo e a variabilidade genética entre os indivíduos. A relevância dos agentes polinizadores animais é enorme, pois que aproximadamente 300.000 espécies vegetais (quase 90% de todas as plantas com flores) necessitam de polinização animal (Ollerton *et al.* 2011). Além disso, aproximadamente 75% das plantas de interesse agrícola cultivadas para produção de alimentos, apresentam aumento de produção devido à polinização animal (Klein *et al.* 2007). Essa interação animal-plantas é muito importante, que muitas plantas deixariam de existir na ausência de seus agentes polinizadores, bem como alguns táxons de insetos, especialmente as abelhas, não sobreviveriam sem os recursos florais (Biesmeijer *et al.* 2006). Entre os agentes polinizadores, as abelhas se destacam, principalmente nos ecossistemas tropicais, onde estimativas sugerem que até 80% das espécies vegetais são polinizadas por estes insetos (Bawa *et al.* 1985).

Atualmente, há evidências do declínio dos polinizadores em escala mundial, em especial de abelhas (Lennartsson 2002; Biesmeijer *et al.* 2006; Girão *et al.* 2007; Dupont *et al.* 2011; Becher *et al.* 2013). Potts *et al.* (2010) apontam como causa para este declínio múltiplos fatores como patógenos, perda e redução de hábitat, competição por recursos com espécies invasoras, práticas agrícolas agressivas, incluindo uso inadequado de pesticidas e mudanças de clima. Nos países em desenvolvimento, cenários de perda de polinizadores são ainda mais preocupantes, pois implicariam numa queda mais severa de produção de alimentos (Aizen *et al.* 2009). Sendo assim, há urgência em se conhecer as espécies de polinizadores importantes para as culturas

agrícolas do Brasil e determinar medidas efetivas para proteção de seus hábitat (Alves-dos-Santos *et al.* 2014). Recentemente Giannini *et al.* (2015) apontaram as principais espécies de polinizadores das culturas agrícolas no Brasil e dentre as espécies cultivadas da família Myrtaceae são reconhecidamente importante as abelhas nativas do gênero *Bombus*, da tribo Meliponini e *Apis mellifera*.

O presente trabalho foi norteado pelas seguintes perguntas: qual o padrão e o período de floração e frutificação do cambuci? O cambuci precisa de polinizadores para formar frutos? Se sim, quais são os polinizadores do cambuci? O odor da flor do cambuci atrai o seus polinizadores? Para responder as nossas questões iniciais dividimos a tese em três capítulos: O primeiro capítulo trata da fenologia reprodutiva (flores e frutos) do cambuci que foi acompanhada durante dois anos em dois locais. O segundo capítulo trata da polinização do cambuci, onde foram feitos testes para conhecer o sistema reprodutivo da espécie e avaliar o papel dos visitantes florais. No terceiro capítulo foi feita uma análise dos compostos voláteis emitidos pelas flores do cambuci e uma avaliação do efeito dos mesmos no comportamento dos visitantes noturnos e crepusculares.

Figura 1. Espécies frutíferas de Myrtaceae. (A) araça – *Eugenia* sp. (~ 4 cm); (B) jaboticaba – *Plinia cauliflora* (~ 2 cm); (C) pitanga – *Eugenia uniflora* (~ 2 cm); (D) goiaba – *Psidium guajava* (~ 6 cm); (E) guamirim – *Myrcia* sp. (~ 3 cm); (F) guabiroba-açú – *Campomanesia adamantinum* (~ 6 cm); (G) guabiroba-cascuda - *Campomanesia* sp. (~ 3 cm); (H) grumixama – *Eugenia brasiliensis* (~ 2 cm); (I) grumixama-amarela - *Eugenia brasiliensis* (~ 2 cm); (J) jambo-vermelho – *Syzygium malaccense** (~ 7 cm); (K) jambo-branco – *Syzygium jambos** (~ 7 cm); (L) jambinho – *Syzygium paniculatum*** (~ 4 cm). * Originária da Ásia. ** Originária da Austrália.

Figura 2. Alguns produtos e eventos que possuem o cambuci como tema principal.

Espécie estudada

Campomanesia phaea apresenta hábito arbóreo, alcançando de 3 a 5 m de altura (Figura 4A), e diâmetro à altura do peito de 20 a 30 cm. As flores medem em torno de 3 cm e os frutos de 5 a 6 cm de diâmetro (região mediana) (Figura 4B e C), são carnosos, suculentos e comestíveis (Lorenzi 1992).

Figura 4. (A) Aspecto geral de *Campomanesia phaea*; (B) flores; (C) fruto.

Áreas de estudo

O estudo foi realizado em três áreas no Estado de São Paulo (Figura 5A) sob o domínio de Mata Atlântica *senso stricto*, com *C. phaea* em condições distintas: uma área de ocorrência natural e duas áreas de cultivo comercial.

A área de ocorrência natural localiza-se no Parque das Neblinas (23°45'S / 46°09'W) (Figura 5B), situado nos municípios de Mogi das Cruzes e Bertioga. Esta reserva possui 2.800 ha de extensão. A cobertura vegetal é heterogênea, com fragmentos de Floresta Ombrófila Densa em diferentes estágios de sucessão e com plantios de eucaliptos entre dois a 50 anos. Nesta área de estudo os indivíduos de *C. phaea* escolhidos ocorrem na borda da mata. No Parque as coletas de dados foram feitas entre setembro a maio nos anos de 2011 a 2014. As áreas de cultivo comercial estão

localizadas em propriedades particulares situadas no município de Mogi das Cruzes. Estas duas propriedades são: Sítio Nagai (23°37'S / 46°11'W) (Figura 5C) com 10 ha, dos quais 4 ha são ocupados com o cultivo de cambuci, 3 ha com Reserva Legal (vegetação natural) e 3 ha com outros cultivos (ameixa e maracujá). Esta propriedade têm aproximadamente 300 árvores de cambuci, das quais 100 encontram-se em fase produtiva (indivíduos com mais de 5 anos de idade). A produção anual gira em torno de três toneladas. Nesta área as coletas de dados foram feitas entre setembro a maio nos anos de 2011 a 2013. Sítio Cambuci Nativa (23°25'S / 46°10'W) (Figura 5D) com 15 ha, dos quais 6 ha são para o cultivo de cambuci e 9 ha são de Reserva Legal. Esta propriedade têm 300 árvores que produzem anualmente em torno de cinco toneladas. Nesta área as coletas foram feitas entre setembro 2013 a janeiro 2015.

O Parque das Neblinas está distante 15 km do Sítio Nagai e 37 km do Sítio Cambuci Nativa. O Sítio Nagai está distante 22 km do Sítio Cambuci Nativa.

O clima da região das três áreas de estudo é do tipo Af (Köppen 1948), caracterizado como tropical constantemente úmido com mais de 2000 mm de pluviosidade anual, sem sazonalidade definida. As altitudes variam de 700 a 1100 metros.

Figura 5. (A) Localização das áreas de estudo no Estado de São Paulo: 1. Parque das Neblinas (B); 2. Sítio Nagai (C); 3. Sítio Cambuci Nativa (D). As linhas amarelas indicam os limites das propriedades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adati, R.T. (2001) Estudo biofarmagnóstico de *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum. Myrtaceae. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 128 pp.
- Aizen, M.A.; Garibaldi, L.A.; Cunningham, S.A.; Klein, A.M. (2009) How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of Botany* 103: 1579-1588.
- Alves-dos-Santos, I.; Aizen, M.; Silva, C.I. (2014) Conservação dos polinizadores. In: *Biologia da Polinização* (Rech *et al.*, Eds). Editora Projeto Cultural, Rio de Janeiro. Pp 527-564.
- Bawa, K.S.; Perry, D.R.; Beach, J.H. (1985) Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. *American Journal of Botany* 72: 331-345.
- Becher, M.A.; Osborne, J.L.; Thorbek, P.; Kennedy, P.J.; Grimm, V. (2013) Towards a systems approach for understanding honeybee decline: a stocktaking and synthesis of existing models. *Journal of Applied Ecology* 50: 868-880.
- Bencke, C.C.; Morellato, P.L.C. (2002) Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 269-275.
- Biesmeijer, J.C.; Roberts, S.P.M.; Reemer, M.; Ohlemuller, R.; Edwards, M.; Peeters, T.; Schaffers, A.P.; Potts, S.G.; Kleukers, R.; Thomas, C.D.; Settele, J.; Kunin, W.E. (2006) Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313: 351-354.
- Dupont, Y.L.; Damgaard, C.; Simonsen, V. (2011) Quantitative historical change in bumblebee (*Bombus* spp.) assemblages of red clover fields. *PLoS ONE* 6, e25172.
- Elzinga, J.A.; Atlan, A.; Biere, A.; Gigord, L.; Weis, A.E.; Bernasconi, G. (2007) Time after time: Flowering phenology and biotic interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 22: 432-439.
- Gentry, A.H. (1974) Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica* 6: 64-68.

- Giannini, T.C.; Boff, S.; Cordeiro, G.D.; Cartolano Jr., E.A.; Veiga, A.K.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Saraiva, A.M. (2015) Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie* 46: 209-223.
- Girão, L.C.; Lopes, A.V.; Tabarelli, M.; Bruna, E.M. (2007) Changes in tree reproductive traits reduce functional diversity in a fragmented Atlantic Forest landscape. *PLoS One* 2, e908.
- Johnson, L.A.S.; Briggs, B.G. (1984) Myrtales and Myrtaceae—a phylogenetic analysis. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 71: 700–756.
- Kawasaki, M.L.; Landrum, L.R. (1997) A rare and potentially economic fruit of Brazil. Cambuci, *Campomanesia phaeaa* (Myrtaceae). *Economic Botany* 51: 403-407.
- Klein, A.M.; Vaissière, B.E.; Cane, J.H.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S.A.; Kremen, C.; Tscharntke, T. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B* 274: 303-313.
- Köppen, W. (1948) *Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra*. Fondo de Cultura Económica. México. 479 pp.
- Landrum, L.R. (1986) *Campomanesia*, Pimenta, *Blepharocalix*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhinium* and *Luma* (Myrtaceae). *Flora Neotropical Monographs* 45. New York Botanical garden, New York: 116-160.
- Landrum, L.R.; Kawasaki, M.L. (1997) The genera of Myrtaceae in Brazil. An illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia* 49: 508-536.
- Lennartsson, L. (2002) Extinction thresholds and disrupted plant–pollinator interactions in fragmented plant populations. *Ecology* 83: 3060-3072.
- Lieth, H. (1974) Purpose of a phenology book. In: *Phenology and seasonality modeling*. (H. Lieth, ed.). Springer, Berlin, p.3-19.
- Lorenzi, H. (1992) *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 368p.
- Lorenzi, H.; Bacher, L.; Lacerda, M.; Sartori, S. (2006) *Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 672p.
- Marchiori, J.N.C.; Sobral, M. (1997) *Dendrologia das angiospermas. Myrtales*. Editora da UFSM, Santa Maria. 304 pp.

- Morellato, L.P.C.; H.F. Leitão-Filho (1992) Padrões de frutificação e dispersão na Serra do Japi. In L. P. C. Morellato (Ed.). Historia natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil, pp. 112-140. Editora da Unicamp/Fapesp, Campinas.
- Ollerton, J.; Winfree, R.; Tarrant, S. (2011) How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321-326.
- Potts, S.G.; Biesmeijer, J.C.; Kremen C.; Neumann P.; Schweiger, O.; Kunin, W.E. (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 345-353.
- Sobral, M.; Proença, C.; Souza, M.; Mazine, F.; Lucas, E. (2015) *Myrtaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 13 Jan. 2015
- Talora, D.C.; Morellato, L.P.C. (2000) Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 23: 13-26.
- Vallilo, M.I; Garbelotti, M.L.; Oliveira, E.; Lamardo, L.C.A. (2005) Características físicas e químicas dos frutos do Cambucizeiro (*Campomanesia phaea*) *Revista Brasileira de Fruticultura* 27: 241-244.
- Van Schaik, C.P.; Terborgh, J.W.; Wright, S.J. (1993) The phenology of tropical forests: adaptative significance and consequences for primary consumers. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 353-377.
- Wilson, P.G.; O'Brien, M.M.; Heslewood, M.M.; Quinn, C.J. (2005) Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* 251: 3-19.

Capítulo 1

**Fenologia reprodutiva do cambuci (*Campomanesia phaea* – Myrtaceae)
em áreas de cultivo comercial e ocorrência natural.**

Capítulo 1 - Fenologia reprodutiva do cambuci (*Campomanesia phaea*: *Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum 1984 - Myrtaceae) em áreas de cultivo comercial e ocorrência natural.

RESUMO

A periodicidade de eventos biológicos afeta as interações entre plantas e animais. A família Myrtaceae tem muitas espécies frutíferas, sendo algumas cultivadas comercialmente, como por exemplo, o cambuci (*Campomanesia phaea*). O objetivo desse estudo foi descrever por dois anos a fenologia reprodutiva (floração e frutificação) de *C. phaea* correlacionando esses eventos com fatores abióticos em diferentes locais: em área de ocorrência natural e área de cultivo comercial. As fenofases de floração e de frutificação foram monitoradas em dez indivíduos em cada área de estudo, sendo analisados o Índice de atividade (sincronia) e o Índice de intensidade (intensidade - Fournier). A sincronia e intensidade de cada fenofase foram correlacionadas com os fatores abióticos temperatura, pluviosidade e comprimento do dia. Os resultados mostraram que a floração e frutificação de *C. phaea* na área de ocorrência natural e cultivo foram diferentes mesmo sob as mesmas condições climáticas. A floração e frutificação foram mais intensas e sincrônicas na área de cultivo quando comparadas com a natural. Os fatores abióticos analisados separadamente não explicaram estas diferenças das fenofases entre as áreas de estudo, porém outras variáveis não estudadas, como a adubação do solo e diversidade de polinizadores também podem influenciar estes eventos.

INTRODUÇÃO

Fenologia é o estudo da periodicidade de eventos biológicos e das causas de sua ocorrência em relação a fatores abióticos e bióticos dentro de uma mesma ou de várias espécies (Lieth 1974). Estudos fenológicos são muito importantes para a compreensão da dinâmica das comunidades vegetais, pois contribuem para o entendimento da regeneração e reprodução das espécies, da organização temporal dos recursos dentro das

comunidades, das interações e da coevolução entre plantas e animais (Talora & Morellato 2000).

No caso de plantas, os eventos fenológicos (fenofases) envolvem brotação de folhas, floração, frutificação e germinação de sementes (Lieth 1974). Os períodos destes eventos são influenciados por fatores abióticos, como pluviosidade, temperatura e irradiação (Frankie *et al.* 1974) que afetam profundamente as interações ecológicas e consequentemente a sobrevivência e sucesso reprodutivo (Elzinga *et al.* 2007).

Gentry (1974) foi um dos primeiros a descrever a fenologia das plantas nas florestas tropicais, categorizando a fenologia de floração em termos de duração, frequência e amplitude e discutindo a significância ecológica de tais categorias em relação à polinização. A associação dos períodos de atividade e dos níveis de intensidade das fenofases facilita a análise do comportamento fenológico da espécie vegetal e das interações animal-plantas, pois combina informações de sincronia de floração e disponibilidade de flores (Bencke & Morellato 2002).

A família Myrtaceae possui entre seus representantes numerosas espécies frutíferas, algumas exploradas comercialmente pelo grande potencial econômico, entre elas o cambuci (*Campomanesia phaea*), uma espécie arbórea (Kawasaki & Landrum 1997), que ocorre em Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Sobral *et al.* 2015). *Campomanesia phaea* é uma espécie autoincompatível e dependente de polinizadores para sua frutificação (Cordeiro *et al.* 2013).

O objetivo desse estudo foi descrever a fenologia reprodutiva (flores e frutos) de *C. phaea* em condições distintas, em área de ocorrência natural e em área de cultivo comercial e relacionar os padrões observados com fatores abióticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

A fenologia reprodutiva de *C. phaea* foi monitorada em área de ocorrência natural (Parque das Neblinas - 23°45'S / 46°09'W) e em área de cultivo (Sítio Nagai - 23°37'S / 46°11'W). As duas áreas de estudo estão distantes por 15 km. A área de ocorrência natural de *C. phaea* tem 2.800 ha de vegetação densa, onde as árvores de cambuci são nativas e bem espaçadas. A área de cultivo comercial de *C. phaea* tem 4 ha com solo adubado (adubo orgânico aplicado a cada 3 meses), no qual 300 árvores plantadas são

adensadas e produzem 5 toneladas/ano de frutos. As áreas de estudo localizam-se no município de Mogi das Cruzes, Estado de São Paulo, e estão sob o Domínio de Mata Atlântica *senso stricto* (Oliveira-Filho & Fontes 2000) e a vegetação local natural é caracterizada por Floresta Ombrófila Densa. O clima da região é do tipo Af (Koppen 1948), ou seja, tropical constantemente úmido, com pluviosidade anual superior a 2000 mm e ausência de sazonalidade definida. As altitudes variam de 700 a 900 m.

A coleta de dados foi feita semanalmente, durante a floração e frutificação de *C. phaea*, em dois ciclos reprodutivos consecutivos, no período de setembro de 2011 a maio de 2012 e de setembro de 2012 a maio de 2013. As fenofases foram monitoradas em dez indivíduos de cada área de estudo, conforme critérios de Fournier & Charpentier (1975). Foram consideradas como floração as flores em antese e como frutificação os frutos verdes e maduros. O padrão de floração foi determinado segundo os critérios propostos por Newstrom *et al.* (1994) e a estratégia de floração de acordo com o proposto por Gentry (1974).

Dois métodos de análise foram aplicados aos dados fenológicos:

1. Índice de atividade: avalia a presença ou ausência de determinado evento fenológico nos indivíduos e é utilizado para estimar a sincronia da fenofase, indicando a proporção de indivíduos de uma população que está manifestando determinado evento fenológico (Bencke & Morellato 2002). Foi considerado como pico de atividade o momento em que o número máximo de indivíduos apresentou determinada fenofase.

2. Índice de intensidade (percentual de intensidade de Fournier): consiste em estimar o percentual de intensidade das fenofases em cada indivíduo. Este método foi proposto por Fournier (1974) onde os valores obtidos em campo são divididos em uma escala semi-quantitativa de cinco categorias (0 a 4) e intervalo de 25% conforme a intensidade da fenofase. O índice foi calculado dividindo-se a soma dos valores de cada indivíduo em um dado mês pelo valor máximo possível (número de indivíduos multiplicado por quatro). O valor obtido, que corresponde a uma proporção, foi multiplicado por 100, para transformá-lo em um valor percentual.

Dados climáticos

Os dados climáticos de temperatura média mensal e pluviosidade acumulada mensal foram fornecidos pela Estação Meteorológica do Parque das Neblinas, localizada no município de Mogi das Cruzes, SP. Os dados meteorológicos foram

considerados para as duas áreas de estudo devido a proximidade entre elas (15 km). Os dados do comprimento do dia (horas luz/dia) do município de Mogi das Cruzes de setembro de 2011 a maio de 2013 foram obtidos através do site do Observatório Naval Americano (<http://www.usno.navy.mil>).

Análise dos dados

A sincronia e a intensidade das fenofases, por meio dos seus dados semanais, foram correlacionadas com as variáveis abióticas ambientais (temperatura média mensal, pluviosidade acumulada mensal e comprimento do dia) através da Correlação de Spearman (ρ) após o teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

Foi considerado correlação significativa o nível de 5% ($p \leq 0,05$) e correlação altamente significativa os valores abaixo do nível de 0,1% ($p \leq 0,001$). Estas análises foram feitas através do programa PAST versão 1.85 (Hammer *et al.* 2001).

RESULTADOS

A floração dos indivíduos de *C. phaea* nas áreas de cultivo e de hábitat natural iniciou com a emissão de flores no mês de outubro e estendeu-se até janeiro nos dois ciclos reprodutivos (Figura 1). Segundo a classificação de Newstrom *et al.* (1994) esta floração estendida por quatro a cinco meses durante uma única vez ao ano, caracteriza-se como anual intermediária. O início da frutificação variou, pois no primeiro ciclo reprodutivo iniciou em dezembro/11 na área de cultivo e em janeiro/12 na área de habitat natural, e em ambas as áreas se estendem até maio/12. No segundo ano do estudo, nas duas áreas a frutificação iniciou em novembro e se estendeu até abril na área de habitat natural e até maio na área de cultivo (Figura 1).

O índice de atividade de floração, na área de cultivo no primeiro período de estudo, mostrou que a floração de *C. phaea* foi altamente sincrônica com 100% ($n = 10$) dos indivíduos floridos entre outubro/11 a janeiro/12. Por outro lado, no segundo período, a sincronia de floração atingiu 100% dos indivíduos apenas durante um mês (Figura 1A). No primeiro período, o índice de atividade para a frutificação na área de cultivo revelou maior sincronia desta fenofase (100%) entre janeiro/12 e março/12, sendo que a proporção de indivíduos com frutos decresce nos meses subsequentes. No

segundo período, a maior sincronia de indivíduos com frutos (100%) foi verificada em dezembro/12 e permaneceu até março/13 (Figura 1A).

O índice de atividade de floração na área de ocorrência natural de *C. phaea*, no primeiro período de estudo, atingiu a sincronia máxima (100%) entre outubro/11 a janeiro/12. No segundo período a floração teve sincronia baixa (50%), pois os indivíduos floriram em meses distintos. A frutificação na área de ocorrência natural foi altamente sincrônica (100%) entre janeiro/12 e fevereiro/12 com todos os indivíduos com frutos. No segundo período, a alta sincronia iniciou em janeiro/13 e permaneceu até fevereiro/13 (Figura 1B).

O índice de intensidade na área de cultivo mostrou que a floração atingiu o pico em dezembro/11 (75%) no primeiro período e em novembro/12 (65%) no segundo período (Figura 2A). Para a fenofase de frutificação, o pico de frutos no primeiro período de estudo ocorreu entre fevereiro/12 e março/12 (75%), enquanto no segundo a maior intensidade de frutificação ocorreu entre janeiro/13 e fevereiro/13 (75%) (Figura 2A).

O índice de intensidade da floração na área de habitat natural de *C. phaea*, no primeiro período do estudo, atingiu o pico entre novembro/11 a dezembro/11 (50%). No segundo período de estudo as flores atingiram o pico de intensidade em dezembro/12 (30%). A fenofase de frutificação atingiu, no primeiro período de estudo, o pico entre março/12 (50%) e no segundo período entre janeiro/13 e fevereiro/13 (45%) (Figura 2B). A maior intensidade de floração foi registrada na área de cultivo, atingindo até 75% em dezembro/11 (Figura 2A), sendo a intensidade máxima desta fenofase na área de ocorrência natural de 50% (Figura 2B). Em ambas as áreas, na maior parte do período de floração foram registradas baixa intensidade desta fenofase (> 50%), ou seja, os indivíduos abrem poucas flores por dia, padrão descrito por Gentry (1974) como estratégia de floração do tipo “*steady state*”.

Figura 1. Fenologia reprodutiva de *C. phaea* em dois ciclos reprodutivos consecutivos, entre setembro de 2011 a maio de 2013: Índice de atividade das fenofases e temperaturas médias mensais na área de cultivo (A) e na área de ocorrência natural (B); Índice de atividade das fenofases e pluviosidades acumuladas mensais na área de cultivo (C) e na área de ocorrência natural (D); Índice de atividade das fenofases e horas luz/dia mensais na área de cultivo (E) e na área de ocorrência natural (F).

Figura 2. Fenologia reprodutiva de *C. phaea* em dois ciclos reprodutivos consecutivos, entre setembro de 2011 a maio de 2013: Índice de intensidade das fenofases e temperaturas médias mensais na área de cultivo (A) e na área de ocorrência natural (B); Índice de intensidade das fenofases e pluviosidades acumuladas mensais na área de cultivo (C) e na área de ocorrência natural (D); Índice de intensidade das fenofases e horas luz/dia mensais na área de cultivo (E) e na área de ocorrência natural (F).

Considerando os dados dos dois períodos estudados, em ambas as áreas, o início da floração ocorreu em outubro com pico em dezembro. Em outubro os valores de temperatura (18°C a 20°C), pluviosidade (168 a 235 mm) e comprimento do dia (12,4 a 12,89 hora luz/dia) começaram a se elevar em relação aos meses anteriores. Índices elevados de intensidade de floração ocorreram entre novembro e dezembro que, em geral, foram os meses com os maiores valores de temperaturas médias (20°C a 23,5°C), maior pluviosidade acumulada mensal (138 a 422 mm) e os meses com os dias mais longos (13,06 a 13,57 horas/dia) (Figuras 1 e 2).

Na área de cultivo a intensidade da floração teve alta correlação negativa significativa com a pluviosidade acumulada mensal ($\rho = -0,59$; $p < 0,001$) e a sincronia de floração teve correlação significativa negativa com a temperatura média ($\rho = -0,35$; $p = 0,05$) e com a pluviosidade acumulada mensal ($\rho = -0,53$; $p = 0,002$). A intensidade de frutificação na área de cultivo apresentou correlação altamente significativa com a temperatura média mensal ($\rho = 0,61$; $p < 0,001$) e correlação significativa com a pluviosidade acumulada mensal ($\rho = 0,45$; $p = 0,002$) e com o comprimento do dia ($\rho = 0,45$; $p = 0,002$). A sincronia de frutificação teve correlação altamente significativa com a temperatura média mensal ($\rho = 0,78$; $p < 0,001$), pluviosidade acumulada mensal ($\rho = 0,60$; $p < 0,001$) e comprimento do dia ($\rho = 0,73$; $p < 0,001$) (Tabela 1). Na área de ocorrência natural, a intensidade e a sincronia de floração apresentaram, respectivamente, correlação altamente significativa ($\rho = 0,61$; $p < 0,001$) e correlação significativa ($\rho = 0,39$; $p = 0,049$) com o comprimento do dia e houve também correlação significativa da intensidade de frutificação com a temperatura média mensal ($\rho = 0,38$; $p = 0,026$) (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados da correlação entre a sincronia e intensidade da floração e frutificação de *C. phaea* com fatores abióticos nas áreas de estudo, em dois ciclos reprodutivos consecutivos, entre setembro de 2011 a maio de 2013.

		Sincronia de floração	Sincronia de frutificação	Intensidade de floração	Intensidade de frutificação
Área de cultivo	Temperatura média mensal	$\rho = -0,35$ $p = 0,05$	$\rho = 0,78$ $p < 0,001$	$\rho = -0,29$ $p = 0,108$	$\rho = 0,81$ $p < 0,001$
	Pluviosidade acumulada mensal	$\rho = -0,53$ $p = 0,002$	$\rho = 0,60$ $p < 0,001$	$\rho = -0,59$ $p < 0,001$	$\rho = 0,45$ $p = 0,002$
	Comprimento do dia	$\rho = 0,11$ $p = 0,567$	$\rho = 0,73$ $p < 0,001$	$\rho = 0,08$ $p = 0,649$	$\rho = 0,45$ $p = 0,002$
Área natural	Temperatura média mensal	$\rho = -0,14$ $p = 0,476$	$\rho = 0,27$ $p = 0,128$	$\rho = 0,15$ $p = 0,480$	$\rho = 0,38$ $p = 0,026$
	Pluviosidade acumulada mensal	$\rho = -0,09$ $p = 0,668$	$\rho = -0,27$ $p = 0,128$	$\rho = 0,16$ $p = 0,451$	$\rho = 0,08$ $p = 0,617$
	Comprimento do dia	$\rho = 0,39$ $p = 0,049$	$\rho = -0,28$ $p = 0,117$	$\rho = 0,61$ $p < 0,001$	$\rho = 0,01$ $p = 0,944$

DISCUSSÃO

A estratégia de floração de *C. phaea* foi do tipo “steady state” conforme a classificação proposta por Gentry (1974). Esta estratégia de floração também foi verificada em outras espécies de Myrtaceae, como *Myrciaria dubia* (Maués & Couturier 2002), *Campomanesia pubescens* e *Psidium firmum* (Proença & Gibbs 1994). Porém outras estratégias de floração são reconhecidas para mirtáceas, como “cornucópia”, com muitas flores por planta, disponíveis em torno de um mês e “big bang”, com floração em massa por planta, em torno de uma semana (Proença & Gibbs 1994).

No clima da Mata Atlântica *senso stricto* (médias de temperatura acima de 18°C e pluviosidade < 2000 mm) as estações seca e úmida não são evidentes (Oliveira-Filho & Fontes 2000), mas a floração das espécies de árvores neste bioma são significativamente sazonais, ocorrendo nos meses mais quentes e úmidos entre novembro a fevereiro (Morellato *et al.* 2000). Nas duas áreas de estudo, *C. phaea*

seguiu o padrão de floração sazonal verificado na Mata Atlântica *sensu stricto* com evento nos meses com maiores valores de temperatura, pluviosidade e comprimento do dia.

Apesar da aparente sazonalidade na floração de *C. phaea* com os meses de maiores valores de temperaturas médias e pluviosidade, estes fatores analisados separadamente tiveram correlações negativas com a intensidade e sincronia de floração. Porém, a floração de *C. phaea* teve correlação positiva e altamente significativa apenas com o comprimento do dia na área natural. Em florestas tropicais úmidas, os picos de floração tendem a ocorrer durante a época do ano de dias mais longos (Van Schaick *et al.* 1993). Assim, mudanças no número de horas luz/dia podem explicar a sazonalidade das espécies de árvores em climas sem clara variação sazonal de temperatura ou pluviosidade (Wright & Van Schaick 1994).

Os fatores abióticos temperatura, pluviosidade e comprimento do dia analisados separadamente (Tabela 1) não explicam a maior intensidade e sincronia da floração na área de cultivo em relação à área de ocorrência natural de *C. phaea* (Figuras 1 e 2). Para ambientes pouco sazonais, como a Mata Atlântica *sensu stricto*, os fatores ambientais devem ter menor influência sobre as fenofases do que em ambientes sazonais (Morellato & Leitão-Filho 1996, Fidalgo & Kleinert 2009). Aide (1988) aponta que nas localidades onde o clima não é sazonal, as causas que atuam sobre as fenofases devem incluir fatores seletivos bióticos, tais como pressão de herbívoros, predadores, competidores, polinizadores e dispersores. No presente estudo de fato a riqueza e frequência dos visitantes florais foram maiores na área de cultivo, onde o número de flores abertas foi maior em comparação com a área de ocorrência natural.

Nas regiões onde a transição da estação seca para a chuvosa é bem evidente, a disponibilidade de água é o principal fator externo controlador da sazonalidade (Morellato *et al.* 1989, Reich 1995). Nestes ambientes percebe-se que a floração de mirtáceas tem forte influência dos abruptos aumentos da umidade nos períodos chuvosos (Kawasaki 1989, Proença & Gibbs 1994). Por outro lado, na região Amazônica onde o clima é muito parecido entre os meses do ano, as espécies de Myrtaceae florescem ao longo do período de menor pluviosidade (Souza 1996). Na região de Manaus o araçá-boi (*Eugenia spittata*) floresce ao longo de todo o ano, porém os picos são nos meses de menor precipitação (Falcão *et al.* 1988).

Outro aspecto interessante no estudo foi a diferença no padrão de intensidade e sincronia de floração de *C. phaea* do primeiro para o segundo período reprodutivo, nas duas áreas investigadas. Na área de ocorrência natural, por exemplo, a intensidade de floração de *C. phaea* no primeiro período chegou a 50% e os indivíduos tiveram alta sincronia de floração durante três meses, já no segundo período, a intensidade de floração foi de apenas 30% e a sincronia de floração foi baixa. Nos dois períodos de floração estudados, foi verificado aumento dos valores de temperatura média de 18 a 20,4°C (1º ano), para 19,8 a 23,5°C (2º ano), e de pluviosidade acumulada de 946 mm (1º ano), para 1227 mm (2º ano). Estes aumentos da temperatura e pluviosidade podem ter influenciado na diferença de intensidade e sincronia de floração de *C. phaea* entre os dois períodos reprodutivos. Estudos recentes apontam que as plantas respondem rapidamente ao aumento da temperatura no planeta, com consequências no padrão de floração, principalmente na época do ano e na intensidade (Fitter & Fitter 2002, Menzel *et al.* 2006, CaraDonna *et al.* 2014). Além disso, mudanças no padrão de floração entre períodos reprodutivos consecutivos podem estar relacionadas a diferenças na pluviosidade. Este evento foi observado por Fidalgo & Kleinert (2009), que verificaram mudanças no padrão de floração entre períodos reprodutivos consecutivos em seis espécies de Myrtaceae na Mata Atlântica *sensu stricto*.

A baixa sincronia de floração diminui as chances do sucesso reprodutivo de espécies autoincompatíveis, pois o sistema reprodutivo exige a transferência de pólen entre indivíduos (Pires *et al.* 2013). A sincronia de floração de espécies que necessitam da polinização cruzada pode ser considerada uma resposta evolutiva para pressões bióticas (Augspurger 1981, Van Schaik *et al.* 1993, Ollerton & Lack 1998). Em *C. phaea*, uma espécie autoincompatível, a frutificação não foi afetada com a redução na sincronia de floração do segundo ciclo reprodutivo (Figura 2). Provavelmente a grande quantidade de pólen oferecido pelas flores de *C. phaea* compense baixas na sincronia de floração.

A frutificação de *C. phaea* foi sazonal destoando do padrão geral das espécies da Mata Atlântica, que geralmente têm as frutificações espaçadas durante o ano (Morellato *et al.* 2000). Na área de cultivo a intensidade e sincronia da frutificação foram altas e tiveram correlações altamente significativas com os fatores abióticos, diferentemente da área de ocorrência natural que teve correlação da frutificação apenas com a temperatura média. Estes resultados apontam para uma possível influência de fatores abióticos na

frutificação de *C. phaea*, porém outros fatores certamente atuam no número de frutos. Uma vez que a frutificação segue a floração, as alterações sobre esta irão afetar os resultados da outra (Van Schaik *et al.* 1993). Por exemplo, na área de cultivo a floração foi mais intensa e sincrônica, ou seja, teve maior oferta de flores em relação à área de ocorrência natural, e com isso um maior número de flores disponíveis para serem polinizadas (Figura 2). Foi registrado também que na área de cultivo a riqueza e frequência de abelhas foram maiores do que na área de ocorrência natural (Capítulo 2). Consequentemente, isto pode contribuir para o aumento na frutificação na área de cultivo. Outro fator que pode explicar para a maior intensidade de frutificação do cambuci na área de cultivo é a prática de adubação do solo, realizada na área de cultivo a cada três meses, visto que em solos mais nutritivos é evidenciada menor taxa de abortos de frutos (Pías & Guitin 2006, Klein *et al.* 2014). A frutificação também pode sofrer influência de outros fatores tais como alocação de recursos energéticos, taxas de aborto natural, predação de frutos e sementes (Wiens 1984, Wiens *et al.* 1987, Charlesworth 1989, Beardsell 1993, Cunningham 2000, Bos *et al.* 2007) que neste caso seriam aspectos limitantes aos frutos.

A grande variedade de características dos frutos apresentada pelas espécies de Myrtaceae está associada a um grupo diversificado de dispersores de sementes, principalmente aves e macacos (Pizo 2002). O gênero *Campomanesia* parece ser predominantemente disperso por mamíferos, especialmente macacos (Gressler *et al.* 2006). O início da floração de *C. phaea* ocorrendo no período mais quente e úmido, garante a disponibilidade de frutos na estação mais úmida, favorecendo a dispersão das sementes, pois é a época de maior atividade de vertebrados dispersores na Mata Atlântica (Tabarelli & Peres 2002). Além disto, as sementes de *C. phaea* também serão dispersas em período favorável para a germinação (Van Schaik *et al.* 1993, Morellato & Leitão Filho 1996).

Os resultados mostram que a intensidade e sincronia da floração de *C. phaea* foram diferentes, mesmo sob as mesmas condições climáticas na área de cultivo e de ocorrência natural. Assim, concluímos que temperatura, pluviosidade e comprimento do dia analisados separadamente não explicam estas diferenças encontradas. Outras variáveis, mas que não foram avaliadas neste estudo, tais como microclimas diferentes entre as áreas, fatores bióticos ou adubação do solo podem ter influenciado a maior intensidade e sincronia da floração na área de cultivo. A frutificação de *C. phaea* teve

correlação com os fatores abióticos, porém outros elementos também podem atuar nesta fenofase, tais como a adubação e diversidade de polinizadores, que certamente têm um papel importante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aide, T.M. (1988) Herbivory as a selective agent on the timing of leaf production in a tropical understory community. *Nature* 336:574-575.
- Augspurger, C.K. (1981) Reproductive synchrony of a tropical shrub (*Hybanthus prunifolius*): influence on pollinator attraction and movement. *Ecology* 62:774-788
- Beardsell, D.V.; O'Brien, S.P.; Williams, E.G.; Knox, R.B & Calder, D.M. (1993) Reproductive biology of Australian Myrtaceae. *Australian Journal of Botany* 41: 511-526.
- Bencke, C.C.; Morellato, P.L.C. (2002) Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 269-275.
- Bos, M.M.; Veddeler, D.; Bogdanski, A.K.; Klein, A.M.; Tschardt, T.; Steffan-Dewenter, I.; Tylianakis, J.M. (2007) Caveats to quantifying ecosystem services: fruit abortion blurs benefits from crop pollination. *Ecological Applications*, 17, 1841–1849.
- CaraDonna, P.J.; Iler, A.M.; Inouye, D.W. (2014) Shifts in flowering phenology reshape a subalpine plant community. *Proceedings of the National Academic Sciences* doi/10.1073/pnas.1323073111
- Charlesworth, D. (1989) Evolution of low female fertility in plants: Pollen limitation, resource allocation and genetic load. *Tree* 4: 289-292.
- Cordeiro, G.D.; Pinheiro, M.; Alves-dos-Santos I. (2013) Reproductive biology and pollination of Cambuci (*Campomanesia phaea* - Myrtaceae), a commercial fruit of the Atlantic Rain Forest. *International Conference on Pollinator Biology, Health and Policy*. p13.

- Cunningham, S.A. (2000) What determines the number of seed produced in a flowering event? A case study of *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* (Arecaceae). Australian Journal of botany 48: 659-665.
- Elzinga, J.A.; Atlan, A.; Biere, A.; Gigord, L.; Weis, A.E.; Bernasconi, G. (2007) Time after time: Flowering phenology and biotic interactions. Trends in Ecology & Evolution 22:432–439.
- Falcão, M.A.; Chavéz Flores, W. B.; Ferreira, S.A.N.; Clement, C. R.; Barros, M.J.B.; Brito, J. M.C.; Santos, T.C.T. (1988) Aspectos fenológicos e ecológicos do araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh) na Amazônia Central. I. Plantas juvenís. Acta Amazônica 18(3-4): 27-38.
- Fidalgo, A.O.; Kleinert, A.M.P. (2009) Reproductive biology of six Brazilian Myrtaceae: is there a syndrome associated with buzz-pollination? New Zealand Journal of Botany, 2009, Vol. 47: 355–365.
- Fitter, A.H.; Fitter, R.S.R. (2002) Rapid changes in flowering time in British plants. Science 296:1689–1691.
- Fournier, L.A. (1974) Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en arboles. Turrialba 24: 422-423.
- Fournier, L.A.; Charpantier, C. (1975) El tamaño de la amostra y la frecuencia de las observaciones em el estudio de las características fenológicas de los árboles tropicales. Turrialba 25(1): 45-48.
- Frankie, G.W.; Baker, H.G.; Opler, P.A. (1974) Tropical plant phenology: applications for studies in community ecology. Pp. 287-296. In: H. Lieth (org.). Phenology and seasonally modeling. Berlin, Springer-Verlag.
- Gentry, A.H. (1974) Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. Biotropica 6: 64–68.
- Gressler, E.; Pizo, M.A.; Morellato, L.P.C. (2006) Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. Revista Brasileira de Botânica 29: 509-530.
- Hammer, O.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analyses. Paleontologia eletrônica 4.
- Kawasaki, M.L. (1989) Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Myrtaceae. Bol. Bot. Universidade de São Paulo 11: 121-170.
- Kawasaki, M.L.; Landrum, L.R. (1997) A rare and potentially economic fruit of Brazil. Cambuci, *Campomanesia phaea* (Myrtaceae). Economic Botany 51: 403-407.

- Klein, A.M.; Hendrix, S.D.; Clough, Y.; Scofield, A.; Kremen C. (2014) Interacting effects of pollination, water and nutrients on fruit tree performance. *Plant biology* doi: 10.1111/plb.12180.
- Köppen, W. (1948) *Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra*. Fondo de Cultura Econômica. México. 479p.
- Lieth, H. (1974) Purpose of a phenology book. In: *Phenology and seasonality modeling*. (H. Lieth, ed.). Springer, Berlin, p.3-19.
- Maués, M.M.; Couturier, G. (2002) Biologia floral e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no Estado do Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 441-448.
- Memmott, J.; Craze, P.G.; Waser, N.M.; Price, M.V. (2007) Global warming and the disruption of plant-pollinator interactions. *Ecol Lett* 10:710–717.
- Menzel, A.; Sparks, T.H.; Estrella, N. (2006) European phenological response to climate change matches the warming pattern. *Global Change Biology* 12:1969–1976.
- Morellato, L.P.C.; H.F. Leitão-Filho (1992) Padrões de frutificação e dispersão na Serra do Japi. In L. P. C. Morellato (Ed.). *Historia natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil*, pp. 112-140. Editora da Unicamp/Fapesp, Campinas.
- Morellato, L.P.C.; Leitão-Filho, H.F. (1996) Reproductive phenology of climbers in a Southeastern Brazilian Forest. *Biotropica* 28:180-191.
- Morellato, L.P.C.; Rodrigues, R.R.; Leitão-Filho, H.F.; Joly, C.A. (1989) Estudo comparativo da fenologia de espécies arbóreas de floresta de altitude e floresta mesófila semi-decídua na Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 12:85-98.
- Morellato, L.P.C.; Talora, D.C.; Takahasi, A.; Bencke, C.C.; Romera, E.C.; Zipparro, V.B. (2000) Phenology of Atlantic Rain Forest trees: A comparative study. *Biotropica* 32: 811-823.
- Newstrom, L.E.; Frankie, G.W.; Baker, H.G. (1994) A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland Tropical Rain Forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* 26: 141-159.

- Oliveira-Filho, A.T.; Fontes, M.A.L. (2000) Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil, and the influence of climate. *Biotropica* 32: 793-810.
- Ollerton, J.; Lack, A. (1998) Relationships between flowering phenology, plant size and reproductive success in *Lotus corniculatus* (Fabaceae) *Plant Ecology* 139: 35–47.
- Pías, B.; Guitián, P. (2006) Breeding system and pollen limitation in the masting tree *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae) in the NW Iberian Peninsula. *Acta Oecologica* 29:97–103.
- Pires, J.P.A.; Silva, A.G.; Freitas, L. (2013) Plant size, flowering synchrony and edge effects: What, how and where they affect the reproductive success of a Neotropical tree species. *Austral Ecology* 39: 328-336.
- Pizo, M.A. (2002) The seed dispersers and fruit syndromes of Myrtaceae in Brazilian Atlantic forest. In *Frugivores and seed dispersers. Biodiversity and conservation perspectives*. (D.J. Levey, W.R. Silva & M. Galetti, eds.), CABI Publishing, Wallingford, p.129-143.
- Proença, C.E.B.; Gibbs, P.E. (1994) Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brasil. *New Phytologist* 126:343-354.
- Reich, P.B. (1995) Phenology of tropical forest: patterns, causes and consequences. *Canadian Journal of Botany* 73: 164-174.
- Sobral, M.; Proença, C.; Souza, M.; Mazine, F.; Lucas, E. (2015) *Myrtaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10324>>. Acesso em: 08/01/2015.
- Souza, M.A.D. (1996) Biologia reprodutiva de onze espécies de Myrtaceae em floresta de terra firme na Amazônia Central. Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 74 pp.
- Tabarelli, M.; Peres, C.A. (2002) Abiotic and vertebrate seed dispersal in the Brazilian Atlantic forest: implications for forest regeneration. *Biological Conservation* 106: 165-176.
- Talora, D.C.; Morellato, L.P.C. (2000) Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 23: 13-26.

- Van Schaik, C.P.; Terborgh, J.W.; Wright, S.J. (1993) The phenology of tropical forests: adaptative significance and consequences for primary consumers. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 353-377.
- Whright, S.J.; Van Schaik, C.P. (1994) Light and the phenology of tropical trees. *American Naturalist* 143: 193-199.
- Wiens, D. (1984) Ovule survivorship, brood size, life story, breeding systems, and reproductive success in plants. *Oecologia* 64: 47-53.
- Wiens, D.; Calvin, C.L.; Wilson, C.A.; Davern, C.I.; Frank, D.; Seavey, S.R. (1987) Reproductive success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. *Oecologia* 71: 501-509.

Capítulo 2

Biologia floral, sistema reprodutivo e polinização do cambuci (*Campomanesia phaea* - Myrtaceae)

Capítulo 2 - Biologia floral, sistema reprodutivo e polinização do cambuci (*Campomanesia phaea* - Myrtaceae)

RESUMO

Este estudo teve como objetivo conhecer a biologia floral, o sistema reprodutivo e os polinizadores do cambuci (*Campomanesia phaea*), visando contribuir com informações que possam servir para o aumento da produtividade desta fruta comercial. Para a biologia floral foram verificados a morfologia dos elementos florais envolvidos no processo de polinização, duração da antese, recursos florais, receptividade do estigma e viabilidade polínica. O sistema reprodutivo foi determinado pela razão P:O e pelos testes de polinização manual. Os visitantes florais de *C. phaea* foram capturados e entre eles foram identificados os polinizadores mais eficientes, conforme número de grãos pólen depositados no estigma e número de frutos formados com uma e duas visitas. As flores de *C. phaea* são hermafroditas, dura um dia, o pólen é o único recurso oferecido aos visitantes florais e a antese é noturna, iniciando por volta das 5 h. O sistema reprodutivo de *C. phaea* é autoincompatível. Foram coletadas 52 espécies de visitantes florais e entre estas as mais eficientes na polinização do cambuci são as abelhas noturnas e crepusculares, *Megalopta sodalis*, *Megommation insigne*, *Ptiloglossa latecalcarata* e *Zikanapis seabrai*. *Apis mellifera* também foi eficiente na polinização de *C. phaea* com visitas crepusculares e diurnas.

INTRODUÇÃO

Um importante serviço ambiental para os ecossistemas terrestres é o da polinização, onde agentes polinizadores são vetores dos grãos de pólen entre as flores e auxiliam na fertilização das plantas. Devido às recompensas florais, principalmente pólen e néctar, as flores atraem os seus polinizadores. Os traços florais, como o odor, facilitam a localização da planta (Dobson 1987) enquanto que a morfologia da flor influencia a estratégia de forrageamento do visitante (Faegri & Van der pijl 1971). Porém, apenas a morfologia floral não é suficiente para determinar se o visitante floral

atua como polinizador de uma dada espécie vegetal (King *et al.* 2013), sendo o comportamento de visita determinante para a eficiência das diferentes espécies de polinizadores (Endress 1994).

As abelhas são os principais agentes polinizadores, estimativas apontam que a maioria das espécies vegetais são polinizadas por estes insetos (Bawa *et al.* 1985). Sendo assim, os polinizadores, principalmente as abelhas, realizam um importante serviço ecossistêmico (Constanza *et al.* 1997) atuando na manutenção das populações vegetais em ambientes naturais (Ollerton *et al.* 2011). Além disso, elas contribuem com o aumento da produtividade em sistemas agrícolas para o fornecimento de recursos alimentares (Ricketts *et al.* 2008). Klein *et al.* (2007) estimaram que 75% da alimentação humana dependem direta ou indiretamente de plantas polinizadas ou são beneficiadas pela polinização animal.

Porém, o cenário atual aponta para um declínio das espécies de abelhas (Biesmeijer *et al.* 2006; Becher *et al.* 2013), o que seria preocupante na queda da produção de alimentos, principalmente para países em desenvolvimento (Aizen *et al.* 2009). Portanto, para o Brasil, é primordial conhecer os seus principais polinizadores para as culturas agrícolas e proteger seus hábitat (Alves-dos-Santos *et al.* 2014; Giannini *et al.* 2015).

Na ausência de polinizadores para a produção agrícola, há tentativas de inserção de polinizadores nas culturas. Na Europa e Estados Unidos existem exemplos de grande sucesso para culturas de grandes extensões, como por exemplo, a alfafa (Bosch & Kemp 2001, Pitts-Singer & Cane 2011). No Brasil, os estudos ainda são poucos, mas as perspectivas para a utilização dos polinizadores de forma comercial são muitas (Camillo 2003, Freitas & Oliveira-Filho 2003, Vilhena & Augusto 2007, Oliveira & Schlindwein 2009, Magalhães & Freitas 2013). Para a família Myrtaceae, que possui espécies frutíferas comerciais, os estudos com a goiaba (*Psidium guajava*), apontaram aumento na produção após a introdução de colméias de *Apis mellifera* (Alves & Freitas 2006, Freitas & Alves 2008).

Apesar do potencial econômico do cambuci (*Campomanesia phaea*) (Kawasaki & Landrum 1997, Adati 2001, Vallilo *et al.* 2005) não havia informação sobre a sua biologia de polinização. Portanto, o objetivo deste estudo foi conhecer a biologia floral, o sistema reprodutivo e os polinizadores do cambuci, com isso gerar informações que possam contribuir com o aumento da produtividade desta espécie frutífera.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados de biologia floral, sistema reprodutivo e dos visitantes florais de *C. phaea* foram coletados semanalmente, durante três períodos de floração, entre os meses de setembro de 2011 a janeiro de 2012, setembro de 2012 a janeiro de 2013 e setembro de 2013 a janeiro de 2014.

Áreas de estudo

O estudo foi realizado no município de Mogi das Cruzes, Estado de São Paulo, em duas áreas de cultivo comercial e uma área de ocorrência natural. As áreas de cultivo comercial localizam-se no Sítio Nagai (23°37'S / 46°11'W) e no Sítio Cambuci Nativa (23°25'S / 46°10'W) e a área de ocorrência natural localiza-se no Parque das Neblinas (23°45'S / 46°09'W) (ver Figura 5 na Introdução geral). As três áreas estão sob o Domínio de Mata Atlântica e o clima é do tipo Af (Köppen 1948), caracterizado como tropical constantemente úmido com mais de 2000 mm de pluviosidade anual, sem sazonalidade definida. As altitudes variam de 700 a 1100 m.

Biologia floral

Para estudar a biologia floral de *C. phaea* foram utilizados 10 indivíduos da área de cultivo do Sítio Nagai. A morfologia da flor foi mensurada com ênfase na descrição, medição e quantificação dos elementos envolvidos no processo de polinização. Botões florais e flores utilizadas foram previamente fixados em FAA 70%. Para quantificar o número médio de óvulos por flor, 15 botões florais de 5 indivíduos foram dissecados e os óvulos contados sob microscópio. Para quantificar o número médio de pólen por antera, 5 anteras de 5 indivíduos destes mesmos botões florais foram maceradas sobre lâmina com solução de glicerina e os grãos de pólen contados sob microscópio. Para estimar o número total de pólen em uma flor, o número médio de pólen por antera foi multiplicado pelo número médio de anteras de uma flor. A morfologia polínica foi investigada por meio de microscopia óptica. Cinco flores de 5 indivíduos foram previamente fixadas em ácido acético, para posterior preparo das lâminas pelo método de acetólise (Erdtman 1966). A morfologia do grão de pólen foi descrita conforme Barth & Barbosa (1972).

Foi verificado o horário da antese, tempo de vida da flor e recursos florais disponibilizados pelas flores de *C. phaea*. A receptividade do estigma foi testada em flores recém-abertas e após 24 h com peróxido de hidrogênio (Dafni *et al.* 2005) e também com peroxtesmo KO (Dafni & Maués 1998). A viabilidade polínica foi testada através da coloração do citoplasma com carmim acético 1,2 % (Radford *et al.* 1974), em flores (N= 5; 5 indivíduos) previamente fixadas em FAA 70%.

Biologia reprodutiva

O sistema reprodutivo de *C. phaea* foi verificado por meio da razão pólen:óvulo (P:O) e de experimentos de polinizações manuais.

A razão pólen:óvulo (P:O) foi calculada dividindo-se o número médio de grãos de pólen pelo número de médio de óvulos por flor. Os resultados da razão P:O foram utilizados como indicador do sistema reprodutivo da planta, conforme as classes definidas por Cruden (1977).

Os experimentos de polinização manual foram realizados em 10 indivíduos na área de ocorrência natural e 10 indivíduos na área de cultivo (Sítio Nagai). Para cada tratamento, 50 botões florais foram ensacados em pré-antese e desenvolvidos os seguintes testes de polinização: 1. agamospermia - botões florais foram emasculados e ensacados; 2. polinização cruzada - grãos de pólen, provenientes de flores de indivíduos diferentes, foram transferidos para o estigma de flores emasculadas de outros indivíduos; 3. autopolinização manual - grãos de pólen foram depositados no estigma da própria flor; 4. autopolinização espontânea - botões florais foram ensacados sem tratamento posterior. Além disso, foram marcados 100 botões florais destinados a verificar a formação de frutos em condições naturais (polinização aberta). Para todos os tratamentos citados acima foram contabilizados o número de frutos formados, peso dos frutos, número de sementes completas e incompletas.

O crescimento dos tubos polínicos foi verificado com microscópio de fluorescência em pistilos de flores autopolinizadas manualmente. Os pistilos foram fixados em FAA 70% nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após as polinizações (N= 5 flores para cada intervalo; 5 indivíduos), amolecidos, clarificados com NaOH por aproximadamente 30 minutos e corados com azul-de-anilina (Martin 1959).

Visitantes florais e polinizadores

Os visitantes florais de *C. phaea* foram capturados com rede entomológica entre o período das 5 h até às 12 h, que compreende o início da antese até a senescência das flores (estames murchos e ausência de pólen).

Foram estabelecidas classes de frequência dos visitantes florais de *C. phaea*, calculadas da seguinte forma: (1) para se obter a frequência por intervalo de tempo, 10 flores foram selecionadas para observação do número de visitas a cada meia hora. O número de visitas de determinada espécie foi dividido pelo total de visitas de todas as espécies naquele intervalo de tempo. (2) para se obter a frequência por dia, foi feita a somatória das frequências de todos os intervalos do dia. O valor obtido foi multiplicado por 100, para transformá-lo em um valor percentual. Com isso obteve-se a frequência relativa de determinada espécie de visitante nas flores de *C. phaea*. Acima de 45% de frequência a espécie foi classificada como “muito frequente”, entre 44,9% e 10% como “frequente” e abaixo de 10% “pouco frequente”.

Durante as visitas nas flores de *C. phaea* foi observado e contabilizado o contato com o ápice do estigma. A frequência relativa dos contatos no estigma foi calculada da seguinte maneira: número de contatos no estigma de determinada espécie de visitante / total de observações de tal espécie. O valor obtido foi multiplicado por 100, para transformá-lo em um valor percentual.

A eficiência na polinização foi avaliada por meio de três tratamentos em flores previamente ensacadas em botão: (1) após a primeira visita de uma determinada espécie, o pistilo da flor foi retirado para a contagem do número de grãos de pólen de *C. phaea* depositados no estigma (PDE) Dafni *et al.* (2005) e um valor médio de PDE foi determinado para cada espécie de visitante floral. (2) após a primeira visita de uma determinada espécie, a flor foi ensacada e a formação do fruto acompanhada; (3) mesmo procedimento foi feito após duas visitas da mesma espécie. Estes dois últimos métodos foram realizados conforme proposto por Ne’eman *et al.* (2010).

Os visitantes florais coletados foram depositados na Coleção Entomológica Paulo Nogueira Neto (CEPANN).

Análise dos dados

As frutificações nos diferentes testes de polinização manual nas áreas de estudo foram comparadas usando o teste de Qui-quadrado, com a utilização da significância de

acordo com a correção de Bonferroni com o nível de 5% ($p \leq 0,05$). O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação do peso dos frutos, número de sementes formadas e número de sementes completas e incompletas entre os tratamentos de polinização aplicados. Estas variáveis foram correlacionadas entre si pelo teste de Correlação de Spearman. Foi considerada correlação significativa o nível de 5% ($p \leq 0,05$).

Os dados de intensidade luminosa (lux) foram coletados por luxímetro digital entre o período das 5h até às 12h a cada 30 minutos na área de cultivo. Esta medição foi realizada quatro vezes, sendo que para os resultados foi utilizada a média.

RESULTADOS

Biologia floral

Campomanesia phaea possui flores hermafroditas, corola branca, actinomorfa, pentâmera, dialipétala e polistêmone (Figura 1A), com $30,4 \text{ mm} \pm 0,38 \text{ mm}$ de diâmetro. As pétalas medem $10,92 \text{ mm} \pm 0,39 \text{ mm}$ de comprimento e $10,36 \text{ mm} \pm 0,62 \text{ mm}$ de largura na parte mediana. A flor possui cerca de 500 estames de coloração amarela, com $7,02 \text{ mm} \pm 0,28 \text{ mm}$ de comprimento e anteras rimosas. Cada antera possui $2436,1 \pm 117,8$ grãos de pólen e cada flor possui $1.218.000,2 \pm 52.611,2$ grãos de pólen. O pólen é o único recurso oferecido aos visitantes florais e apresenta tamanho pequeno ($20\mu\text{m}$), formato triangular com lados ligeiramente côncavos, aberturas do tipo brevicolpado (curta) e superfície lisa (Figura 1B). A flor possui ovário ínfero, estilete único e terminal, de coloração amarela, com $8,26 \pm 0,09 \text{ mm}$ de comprimento e estigma arredondado. O ovário possui $111,6 \pm 12,1$ óvulos. As flores de *C. phaea* apresentam hercogamia, com o estilete mais alto que as anteras.

Os botões florais de *C. phaea* (Figura 1C) duraram cerca de 30 dias, desde a formação até o início da antese. A antese de *C. phaea* inicia durante a madrugada por volta das 4h30 com a abertura lenta das pétalas do botão floral (Figura 1D) e posterior distensão do estigma e estames, a flor encontra-se totalmente aberta por volta das 5h. No final da antese após a abertura total da flor o estigma já está receptivo e o pólen disponível, com isso não ocorre diferenciação temporal na maturação dos órgãos reprodutivos de *C. phaea*. A flor e a receptividade estigmática duram dois dias. As

antras estão com o pólen disponível (Figura 1E) somente no primeiro dia de antese e apenas no período da manhã, até aproximadamente às 12h, após este horário as antras encontram-se praticamente vazias e começam a escurecer e murchar (Figura 1F). No segundo dia de antese as flores perdem as pétalas. A média da viabilidade polínica de *C. phaea* foi de 90,3%.

Figura 1. Flor de *Campomanesia phaea*. (A) flor recém-aberta; (B) Vista polar do grão de pólen; (C) botão floral na fase inicial de formação; (D) botão floral em pré-antese; (E) detalhe das antras cheias de pólen, no primeiro dia da antese; (F) flor no segundo dia de antese com estames murchos, antras secas e vazias.

Sistema reprodutivo

Campomanesia phaea é autoincompatível, uma vez que não houve formação de frutos nos tratamentos de autopolinização manual. Esta espécie também não forma frutos por agamospermia. O sucesso reprodutivo em *C. phaea* variou de 30% a 38% nos testes de polinização cruzada e de 21% a 28% no controle (Tabela 1). Não houve diferença significativa na frutificação entre os testes de polinização cruzada e de

polinização aberta (controle) na área natural ($p= 0,3463$), e também não foi verificada esta diferença na área de cultivo ($p= 0,3738$). Na comparação entre as áreas de estudo, não houve diferença significativa ($p= 0,3699$) nas formação de frutos de polinização aberta (controle). A razão pólen:óvulo (P:O) de *C. phaea* é de 10913,9 o que a define como uma espécie com sistema reprodutivo autoincompatível.

Tabela 1. Número de frutos formados e sucesso reprodutivo (%) dos tratamentos de polinizações manuais e polinização aberta (controle) de *Campomanesia phaea* em área de ocorrência natural e cultivo comercial, no município de Mogi das Cruzes, SP no período de setembro de 2011 a maio de 2013.

Tratamentos (N)	Núm. de flores tratadas por área	Núm. de frutos	
		Área	Área de
		natural	cultivo
Polinização cruzada	50	15 (30%)	19 (38%)
Autopolinização manual	50	0	0
Autopolinização espontânea	50	0	0
Agamospermia	50	0	0
Controle (polinização aberta)	100	21 (21%)	28 (28%)

Os resultados da microscopia de fluorescência demonstraram que os tubos polínicos provenientes de autopolinizações manuais crescem ao longo do estilete (Figura 2A-B), muitos deles alcançando o ovário e penetrando os óvulos 48 horas após a polinização (Figura 2C-D).

Figura 2. Fotomicrografias do pistilo de *C. phaea*. (A-B) Crescimento dos tubos polínicos ao longo do estilete de uma flor autopolinizada. (C-D) Óvulos de uma flor autopolinizada, com penetração dos tubos polínicos após 48 horas da polinização.

Os frutos formados por polinização aberta (controle) foram mais pesados do que aqueles formados no teste de polinização cruzada manual, com diferença altamente significativa ($p < 0,001$). Porém, o número de sementes viáveis foi maior no teste de polinização cruzada manual do que na polinização aberta ($p = 0,025$) (Tabela 2). Houve correlação significativa marginal entre peso e número de sementes ($p = 0,05$), mas não houve correlação entre peso dos frutos e número de sementes viáveis ($p = 0,9$).

Tabela 2. Peso dos frutos, número de sementes formadas e número de sementes viáveis nos testes de polinização cruzada e controle do cambuci na área cultivada, com os respectivos valores de média, desvio padrão e significância de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Testes	Núm. de frutos avaliados	Peso dos frutos	Núm. de sementes	Núm. de sementes viáveis
Polinização cruzada	12	$26,5 \pm 11,8$	$11,2 \pm 0,9$	$7,2 \pm 2,6$
Controle	30	$38,9 \pm 9,9$	$11,8 \pm 0,9$	$4,4 \pm 2,8$
<i>p</i>		$< 0,001$	0,395	0,025

Visitantes florais e polinizadores

Foram coletados 371 visitantes nas flores de *C. phaea*, pertencentes a 52 espécies de insetos, sendo: 44 espécies de abelhas, cinco espécies de dípteros, duas espécies de vespas e uma espécie de lepidóptero. A riqueza dos visitantes e a abundância de indivíduos coletados na área de cultivo foi maior em relação a área de ocorrência natural de *C. phaea*: 44 espécies e 339 indivíduos contra 21 espécies e 32 indivíduos. Trinta e uma espécies foram exclusivas na área do cultivo, oito exclusivas da área de ocorrência natural e 13 foram comuns as duas áreas (Tabela 3). Algumas das espécies coletadas nas duas áreas de estudo estão representadas nas Figura 3.

Tabela 3. Número de indivíduos dos visitantes florais de *Campomanesia phaea* nas áreas de cultivo comercial e em área de ocorrência natural no município de Mogi das Cruzes-SP, em três ciclos de floração, entre setembro a janeiro dos anos 2011, 2012 e 2013.

Espécies	Cultivo	Natural
Apidae		
Apini		
<i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758	142	7
Bombini		
<i>Bombus brasiliensis</i> Lepeletier, 1836	5	2
<i>Bombus morio</i> Swederus, 1787	4	
Centridini		
<i>Centris (Melacentris) confusa</i> Moure, 1960	1	
<i>Epicharis (Epicharitides) obscura</i> Friese, 1899	1	
Euglossini		
<i>Euglossa anodorhynchi</i> Nemésio, 2006	1	
Meliponini		
<i>Melipona bicolor</i> Lepeletier, 1836	3	
<i>Melipona quadrifasciata</i> Lepeletier, 1836	12	
<i>Paratrigona subnuda</i> Moure, 1947	16	1
<i>Partamona helleri</i> Friese, 1900	23	
<i>Schwarziana quadripunctata</i> Lepeletier, 1836	2	
<i>Trigona spinipes</i> Fabricius, 1793	24	
Tapinotaspidini		
<i>Lophopedia nigrispinnis</i> (Vachal, 1909)	1	
<i>Paratetrapedia fervida</i> (Smith, 1879)	2	
<i>Paratetrapedia volatilis</i> (Smith, 1879)	1	1
<i>Trigonopedia</i> sp.1	7	
<i>Trigonopedia</i> sp.2	1	1
Eucerini		
<i>Thygater analis</i> Lepeletier, 1841	1	
<i>Thygater armandoi</i> Urban, 1999	1	
<i>Thygater paranaensis</i> Urban, 1967	2	
<i>Trichocerapis mirabilis</i> (Smith, 1865)	1	
Colletidae		
Diphaglossini		
<i>Ptiloglossa latealcarata</i> Moure, 1945	25	4
<i>Zikanapis seabrai</i> Moure, 1953	5	1

Continuação Tabela 1

Espécies	Cultivo	Natural
Hylaeini		
<i>Hylaeus (Hylaeopsis) sp.</i>	1	
<i>Hylaeus sp.1</i>		1
<i>Hylaeus sp.2</i>	2	1
<i>Hylaeus sp.3</i>		1
Halictidae		
Augochlorini		
<i>Augochlora sp.1</i>		1
<i>Augochlora sp.2</i>	1	
<i>Augochloropsis electra</i> (Smith, 1853)	1	1
<i>Augochloropsis sp.1</i>	1	1
<i>Augochloropsis sp.2</i>	1	
<i>Augochloropsis sp.3</i>		1
<i>Augochloropsis sp.4</i>		1
<i>Neocorynura sp.</i>	1	
<i>Pseudaugochlora callaina</i> Almeida, 2008		1
<i>Pseudaugochlora erythrogaster</i> Almeida, 2008	1	
<i>Megalopta sodalis</i> (Vachal, 1904)	15	2
<i>Megommation insigne</i> (Smith, 1953)	6	2
Halictini		
<i>Dialictus sp.1</i>	1	1
<i>Dialictus sp.2</i>		1
<i>Dialictus sp.3</i>		1
Megachilidae		
Megachilini		
<i>Megachile (Moureapis) sp.1</i>	1	
<i>Megachile (Moureapis) sp.2</i>	1	
Vespidae		
Vespidae sp.1	2	
Vespidae sp.2	1	
Syrphidae		
<i>Ocyptamus sp.1</i>	1	
<i>Ocyptamus sp.2</i>	1	
<i>Ornidia obesa</i> (Fabricius, 1775)	1	
<i>Palpada pygolampa</i> (Wiedemann, 1830)	3	
<i>Sphiximorpha barbipes</i> Loew, 1853	1	
Nymphalidae		
<i>Heliconius sp.</i>	1	

Figura 3. Visitantes florais de *Campomanesia phaea*. (A) *Ptiloglossa latecalcarata*; (B) *Bombus brasiliensis*; (C) *Bombus morio*; (D) *Megommation insigne*; (E) *Megalopta sodalis*; (F) *Apis mellifera*; (G) *Augochlorini* sp.; (H) *Melipona quadrifasciata*; (I) *Melipona bicolor*; (J) *Partamona helleri*; (K) *Paratrigona subnuda*; (L) *Ocyrtamys* sp.1.

A frequência das espécies dos visitantes florais de *C. phaea* variou conforme a hora do dia (Figura 4). No início da antese, entre 5h e 5h30, ainda sem luz solar, as abelhas noturnas/crepusculares *Ptiloglossa latecalcarata*, *Megommation insigne*, *Megalopta sodalis* e *Zikanapis seabrai* foram os únicos visitantes florais observados, sendo a primeira muito frequente nas flores e as demais frequentes. No período crepuscular, entre às 5h30 e 6h, estas mesmas espécies são frequentes, registrando-se neste período as primeiras visitas de *Apis mellifera*. Ao nascer do sol às 6h, as espécies

noturnas/crepusculares (*Ptiloglossa latecalcarata*, *Megommation insigne*) foram pouco frequentes, *Apis mellifera* foi muito frequente e as demais espécies diurnas pouco frequentes. Após as 6h30, *Apis mellifera* é a única espécie frequente e as demais espécies são pouco frequentes (Figura 4). A Figura 5 mostra visitas sequenciais das espécies de abelhas noturnas/crepusculares e crepusculares/diurnas (*Apis mellifera*). Com a alta frequência de visitas durante o período da manhã e consequente retirada de pólen, às 12h as anteras já se encontram vazias, sendo que a partir deste horário não houve registro de visitas às flores.

Figura 4. Frequência (%) dos visitantes florais de *C. phaea* e intensidade luminosa na área de cultivo comercial por intervalo de tempo analisado. O nascer do sol está indicado com a ilustração do sol. A percentagem no topo indica a frequência de visitantes entre 5 h às 12 h. Note que até o nascer do sol já ocorreram 50% das visitas.

Figura 5. Fotos sequenciais dos visitantes noturnos e crepusculares nas flores de *Campomanesia phaea*. (A-C) *Megalopta sodalis*; (D-F) *Ptiloglossa latealcarata*; (G-I) *Megommation insigne*; (J-L) *Apis mellifera*. A sequência ilustra a coleta de pólen e o contato com o estigma.

Somente as espécies de *Bombus*, Centridini, *Ptiloglossa latealcarata* e *Zikanapis seabrai* contataram as estruturas reprodutivas em 100% das visitas (Figura 6). Estas abelhas, exceto *Bombus*, acessam as flores “abraçando” um grupo de estames e coletam o pólen por vibração. Como são de grande porte, sempre tocam o estigma com a parte ventral do tórax e abdome (Figura 3A). As espécies de *Bombus* coletam o pólen raspando as anteras (Figura 3B-C). As espécies *Megommation insigne* (Figura 3D, 5A-C) e *Megalopta sodalis* (Figura 3E, 5G-I) coletaram o pólen vibrando as anteras e contataram o estigma em 66% e 55% das visitas, respectivamente (Figura 6). As

espécies de Eucerini, Megachilini, Tapinotaspidini, *Apis mellifera* e *Euglossa anodorhynchi* ocasionalmente contatam o estigma das flores ao girar em círculos sobre os estames, momento em que raspam as anteras para coletar o pólen (Figura 3F). As espécies de Augochlorini e *Melipona* (Figura 3G-I) coletam o pólen por vibração e ocasionalmente contatam o estigma. As espécies de Halictini também coletam o pólen por vibração, mas não contatam o estigma. As demais espécies de Meliponini (Figura 3J-K) e *Hylaeus* raspam as anteras para obter o pólen e não contatam o estigma das flores. As espécies de Diptera, Lepidoptera e Vespidae pousam sobre as anteras e permanecem quase imóveis se alimentando de pólen (Figura 3L), dessa forma não contatam o estigma.

Figura 6. Frequência de contato das espécies de abelhas com o estigma das flores de *C. phaea*. Número de visitas observadas por espécie: *Bombus* spp. (N=27), *Centris confusa* (N=3), *Epicharis obscura* (N=5), *Ptiloglossa latecalcarata* (N=25), *Zikanapis seabrai* (N=15), *Megommation insigne* (N=15), *Megalopta sodalis* (N=15), *Megachile* spp. (N=6), Eucerini spp. (N=8), *Apis mellifera* (N=61), *Euglossa anodorhynchi* (N=6), *Melipona* spp. (N=21), Augochlorini spp. (N=18), Tapinotaspidini spp. (N=8). As primeiras cinco espécies são de grande porte.

A Tabela 4 apresenta os resultados dos testes de eficiência de polinização dos visitantes florais após uma ou duas visitas e a quantidade de deposição de pólen no estigma. As abelhas que depositaram maior quantidade de pólen no estigma de *C. phaea* foram: *Megalopta sodalis*, *Apis mellifera*, *Ptiloglossa latecalcarata*, e *Zikanapis seabrai*. Do total de flores (N=19) que receberam uma visita de *Megommation insigne* foram formados 10 frutos (53%), e quando as mesmas visitaram duas vezes as flores ocorreu 100% de frutificação (N=2). Outros visitantes que foram eficientes com apenas uma visita foram *Megalopta sodalis*, *Ptiloglossa latecalcarata*, e *Zikanapis seabrai*, com mais de 30% de frutos formados. Todas estas espécies são de hábito noturno/crepuscular e visitam as flores antes do nascer do sol. *Apis mellifera* que ocasionalmente contata o estigma, formou frutos apenas com duas visitas. Por outro lado, as espécies de *Bombus*, que sempre contatam o estigma (Figura 6), em 12 flores visitadas (com uma visita cada) não houve formação de frutos (Tabela 4).

Tabela 4. Testes de eficiência de polinização dos visitantes florais em *Campomanesia phaea* através do número médio de grãos de pólen $\pm$ desvio padrão depositados no estigma (n =número de visitas) e formação de frutos com uma e duas visitas (n =número de flores), realizados na área de cultivo comercial no município de Mogi das Cruzes-SP, entre o período de setembro de 2012 a janeiro de 2013 e setembro de 2013 a janeiro de 2014.

Espécie	Núm. pólen depositados no estigma (n)	Frutos formados	
		1 visita (n)	2 visitas (n)
<i>Apis mellifera</i>	81 $\pm$ 72 (14)	0 (26)	9 (26)
<i>Augochlorini</i> spp.	9 $\pm$ 5 (7)	0 (5)	
<i>Bombus</i> spp.	20 $\pm$ 40 (9)	0 (12)	
<i>Eucerini</i> spp.	15 $\pm$ 6 (3)	0 (3)	
<i>Megachile</i> spp.	10 $\pm$ 3 (2)		
<i>Megalopta sodalis</i>	85 $\pm$ 80 (10)	6 (12)	0 (2)
<i>Megommation insigne</i>	39 $\pm$ 66 (21)	10 (19)	2 (2)
<i>Melipona</i> spp.	14 $\pm$ 20 (4)	0 (5)	
<i>Ptiloglossa latecalcarata</i>	70 $\pm$ 69 (28)	7 (17)	10 (20)
<i>Tapinotaspidini</i> spp.	2 $\pm$ 5 (2)		
<i>Paratrigona subnuda</i>	0 (3)		
<i>Partamona helleri</i>	0 (5)		
<i>Trigona spinipes</i>	0 (5)		
<i>Zikanapis seabrai</i>	61 $\pm$ 54 (4)	1 (3)	

DISCUSSÃO

A flor de Myrtaceae é caracterizada como flores abertas do tipo prato (Faegri & van der Pijl 1971, Endress 1994) e sua estrutura geral varia pouco entre os seus

representantes quando comparada com outras famílias (Lughadha & Proença 1996). Em Myrtaceae flores menores são mais comuns, embora o tamanho varie de pequeno (< 1,5 cm de diâmetro), como em *Calyptanthus* e *Myrcia* a relativamente grande (> 2,0 cm), como em *Acca* e *Campomanesia* (Gressler *et al.* 2006). A flor de *Campomanesia phaea* segue a estrutura padrão da família, porém o seu tamanho (> 3,0 cm) é maior que a maioria das outras mirtáceas.

O tipo floral de *C. phaea* favorece a visita por diversos grupos de visitantes florais, mas no presente estudo as flores foram visitadas apenas por insetos, possivelmente devido ao fato desta espécie oferecer somente pólen como recurso. Outros gêneros de Myrtaceae, como *Eucalyptus* e *Syzygium* originários da Austrália, secretam néctar, o que faz com que os visitantes florais observados além dos insetos, incluam também marsupiais, morcegos, pássaros e répteis (Armstrong 1979, Hopper 1980, Crome & Irvine 1986, Whitaker 1987, Roitman *et al.* 1997). Nas mirtáceas brasileiras são poucas as evidências de produção de néctar, observada em *Myrciaria cauliflora* (Malerbo *et al.* 1991), *Myrciaria dubia* (Maués & Couturier 2002), *Psidium guajava* e *Eugenia* spp. (Ramalho *et al.* 1990).

Na Mata Atlântica o pólen de Myrtaceae tem uma grande importância para as abelhas, visto que em um levantamento extenso neste bioma Wilms (1995) mostrou que 36% das espécies de abelhas visitam espécies de Myrtaceae para o consumo deste recurso. Nas áreas de Mata Atlântica algumas espécies do gênero *Melipona* têm o pólen de Myrtaceae como uma das principais fontes de alimento (Wilms & Wiechers 1997, Oliveira-Abreu *et al.* 2014) e em ninhos de *Hylaeus* (Colletidae) revelou-se a predominância de grãos de pólen desta família (Cordeiro & Alves-dos-Santos 2008).

A grande quantidade de pólen na flor de *C. phaea* e sua elevada viabilidade (90,3%) fazem com que a taxa pólen:óvulo seja alta, o que é característico de espécies autoincompatíveis (Cruden 1977). A autoincompatibilidade de *C. phaea* foi confirmada por meio dos testes manuais de polinização, visto que das 100 flores que foram autopolinizadas não geraram fruto. Porém, as imagens da microscopia de fluorescência mostraram que nas autopolinizações o pólen germina no estigma e os tubos polínicos crescem ao longo do estilete e chegam até os óvulos. Sendo assim, o não desenvolvimento dos frutos de *C. phaea* provenientes de autopolinizações manuais pode ser indicativo da existência de mecanismos de autoincompatibilidade de ação tardia (Gibbs & Bianchi 1993). Nas espécies de interesse econômico é importante o

entendimento do sistema de autoincompatibilidade, pois pode gerar informações úteis no planejamento de estratégias de melhoramento e composição de pomares, os quais venham a garantir uma adequada polinização (Schifino-Wittmann & Dall'Agnol 2002).

O sistema reprodutivo de *C. phaea* é alogamo obrigatório para, com isso a espécie depende de vetores de pólen para que ocorra a frutificação. Isto também foi verificado para *Campomanesia velutina* (Proença & Gibbs 1994), por outro lado em *Campomanesia pubescens* ocorre uma pequena taxa de autopolinização mesmo sendo predominante alógama (Torenzan-Silingardi & Del-Claro 1998). Conforme Bawa (1974), o sistema reprodutivo da grande maioria das espécies arbóreas nas florestas tropicais é autoincompatível, o que evidencia a importância dos polinizadores na manutenção destes ecossistemas.

O número de espécies e a abundância de visitantes florais foram maiores na área de cultivo, este fato aliado a maior proximidade entre os indivíduos de *C. phaea* poderia refletir na maior frutificação (polinização aberta - controle) em relação a área de ocorrência natural. Como foi destacado por Bawa *et al.* (1985) com a estrutura das florestas tropicais ocorre menos transporte de pólen entre indivíduos. Porém na área de ocorrência natural mesmo com baixa densidade das árvores de *C. phaea* e menor número de visitantes florais, não houve diferença significativa da frutificação em relação a área de cultivo. Provavelmente outros fatores não mensurados neste estudo devem estar igualando as taxas de frutificação nas duas áreas de estudo, como exemplos especulativos a alocação de recursos energéticos, depressão endogâmica, taxas de aborto natural e predação de frutos (Wiens 1984, Wiens *et al.* 1987, Bertin *et al.* 1989, Charlesworth 1989, Beardsell 1993, Cunningham 2000, Korbecka *et al.* 2002, Bos *et al.* 2007).

As abelhas foram os principais visitantes florais de *C. phaea*, o que reafirma o padrão para as mirtáceas no Brasil. As espécies de Meliponini, Bombini e *Apis mellifera* foram apontadas nas revisões de Lughadha & Proença (1996) e Gressler *et al.* (2006) como os principais polinizadores de Myrtaceae no Brasil. Porém, a maioria dos estudos utilizados nestas revisões usaram a frequência de visita e o contato no estigma dos visitantes florais para definir os polinizadores. Dessa forma, poucos podem realmente comprovar a eficiência de polinização das espécies apontadas como polinizadoras e outras espécies podem estar sendo subestimadas apenas por não serem frequentes. A frequência de visitação e eficiência de polinização são independentes (Mayfield *et al.*

2001). Indicar as espécies mais frequentes como polinizadoras pode ser um erro interpretativo, visto que estas não necessariamente atuam como polinizadores (King *et al.* 2013), fato bem documentado por Primack & Silander (1975) e Popic *et al.* (2013). Mesmo a taxa de contato no estigma, que costuma ser muito utilizada para definir os potenciais polinizadores pode ser enganosa (Olsen 1997, Petanidou & Potts 2006, Ne'eman *et al.* 2010). Isto foi constatado no presente estudo com *C. phaea*, pois foi verificado que as espécies *Megalopta sodalis* e *Megommation insigne*, que nem sempre contatam o estigma, foram mais eficientes na frutificação do que *Bombus morio*, que contata o estigma em 100% das visitas. Este resultado, provavelmente deve-se ao fato de que *M. sodalis* e *M. insigne* visitam as flores de *C. phaea* no início da antese, momento em que a quantidade de pólen disponível é maior, e assim estas abelhas depositam mais pólen no estigma do que as espécies de *Bombus*, que visitam as flores quando tem menos pólen disponível. A menor contribuição de espécies de *Bombus* na frutificação também poderia estar associada ao padrão de visitaço deste grupo de abelha, que tendem a realizar mais visitas entre flores co-específicas.

Apesar da flor de *C. phaea* favorecer a visita de muitas espécies de insetos (N= 52), podendo ser considerada generalista, poucas espécies (cinco) foram eficientes na polinizao. Isto demonstra que mesmo para uma flor generalista as condies para uma espécie ser polinizadora so mais especializadas do que somente a visitao (King *et al.* 2013). Os polinizadores mais eficientes de *C. phaea* foram as abelhas noturnas/crepusculares (*Megalopta sodalis*, *Megommation insigne*, *Ptiloglossa latecalcarata*, *Zikanapis seabrai*) e *Apis mellifera* que diurna, mas tambm realizou visitas no perodo crepuscular. O fato de estas abelhas coletarem os seus recursos em flores durante a noite, sem competio com os visitantes florais diurnos, citado como o maior valor adaptativo deste comportamento (Wcislo *et al.* 2004, Wcislo & Tierney 2009). As abelhas noturnas e crepusculares tem a viso adaptada para pouca luz, pois os olhos compostos e os ocelos so maiores em comparao com as abelhas diurnas (Jander & Jander 2002, Warrant *et al.* 2004) e fisiologicamente adaptados para a viso noturna (Greiner *et al.* 2004a,b, Berry *et al.* 2011). Por outro lado, *Apis mellifera* que principalmente diurna, mas tambm pode ser crepuscular (Roubik 1989, Warrant *et al.* 1996, Carneiro & Martins 2012) possui adaptaes para captar ftons de luz o que permite a atividade durante os perodos de pouca luminosidade, alm de no ser limitante com a luz solar (Warrant *et al.* 1996).

Conforme Michener (2007) “*Bee biologists tend to work in warm sunny places during pleasant times of day*”. Assim, o hábito de realizar coletas somente durante o dia, pode contribuir para que as espécies de abelhas noturnas sejam pouco estudadas e raramente mencionadas como polinizadores. Neste sentido, Proença & Gibbs (1994) alertaram que espécies de abelhas visitantes noturnas podem estar sendo subestimadas na polinização de Myrtaceae, por estas ocorrerem em períodos não comuns de coleta. Nos estudos com mirtáceas com antese noturna, e que houve amostragem antes do nascer do sol, percebeu-se um grande número de visitas das abelhas noturnas/crepusculares (Souza 1996, Proença & Gibbs 1994). Assim, espécies de Myrtaceae com antese noturna devem ser melhor estudadas quanto sua interação com as abelhas noturnas, principalmente com as espécies de Halictidae e Colletidae.

A interação das abelhas Colletidae com Myrtaceae é bastante estreita na Austrália (Michener 1965, Armstrong 1979) e também nos Neotrópicos (Frankie *et al.* 1983, Proença & Gibbs 1994). Colletidae e Myrtaceae têm origem na Gondwana e se diversificaram no período Cretáceo (Johnson & Briggs 1984, Almeida *et al.* 2012), com histórias evolutivas mútuas (Proença 1992). Na espécie de Myrtaceae estudada, *C. phaea*, duas espécies de Colletidae (*Ptiloglossa latecalcarata* e *Zikanapis seabrai*) estão entre as mais eficientes na polinização.

Outro polinizador de *C. phaea* é *Apis mellifera*, que foi muito frequente após o nascer do sol, mas contata o estigma apenas em 30% das visitas. O tamanho corpóreo de *Apis mellifera* dificulta o seu contato com o ápice do estigma de *C. phaea*. Com isso, uma única visita desta abelha nas flores de *C. phaea* não resulta em formação de frutos, porém quando visita por mais de uma vez a mesma flor aumentam se as chances de polinização. Torenzan-Silingardi & Del-Claro (1998) com *Campomanesia pubescens* testaram a eficiência de polinização de *A. mellifera* com mais de uma visita e a frutificação foi muito baixa. *Apis mellifera* é eficiente na polinização da goiabeira (*Psidium guajava*) com apenas uma visita, a partir de duas visitas aumenta a produção de sementes por fruto (Freitas & Alves 2008). Para *Megommation insigne* e *Ptiloglossa latecalcarata* a eficiência de polinização nas flores de *C. phaea* também aumenta com mais de uma visita.

A presença nos cultivos de cambuci de *Apis mellifera* junto com polinizadores nativos pode contribuir para o incremento da polinização, e consequente aumento na produção dos frutos. Garibaldi *et al.* (2013) mostraram que em cultivos agrícolas onde

ocorrem ambos, *Apis mellifera* e polinizadores nativos, a produção é maior do que quando estão separados. A interação inter-específica dos visitantes florais é citada como uma explicação para este aumento na polinização e produção, pois provoca maior movimentação entre as plantas promovendo assim maior transferência de pólen (Greenleaf & Kremen 2006, Brittain *et al.* 2013)

A inserção de colmeias de *Apis mellifera* nos cultivos de cambuci pode elevar a produtividade do fruto. Porém, os outros polinizadores eficientes de *C. phaea*, as espécies de abelhas noturnas e crepusculares, não são passíveis de serem criados racionalmente, devido ao hábito de nidificação (Rozen 1984, Almeida 2008, Jansen 1968, Wcislo *et al.* 2004, Santos *et al.* 2010). Diante deste cenário, para aumentar a produtividade do cambuci, são necessárias boas práticas nas áreas de cultivo para manter ou aumentar a população das abelhas noturnas e crepusculares. As atitudes mais comuns e mais rápidas seriam a manutenção da vegetação nativa no entorno das áreas de cultivos e a não utilização de inseticidas que possam eliminar estes visitantes florais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adati, R.T. (2001) Estudo biofarmagnóstico de *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum. Myrtaceae. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Almeida, E.A.B. (2008) Colletidae nesting biology (Hymenoptera: Apoidea). *Apidologie* 39: 16-29.
- Almeida, E.A.B.; Pie, M.R.; Brady, S.G.; Danforth, B.N. (2012) Biogeography and diversification of colletid bees (Hymenoptera: Colletidae): emerging patterns from the southern end of the world. *Journal of Biogeography* 39: 526–544.
- Alves-dos-Santos, I.; Aizen, M.; Silva, C.I. (2014) Conservação dos polinizadores. In: *Biologia da Polinização* (Rech *et al.*, Eds). Editora Projeto Cultural, Rio de Janeiro. Pp 527-564.
- Alves, J.E.; Freitas, B.M. (2006) Comportamento de pastejo e eficiência de polinização de cinco espécies de abelhas em flores de goiabeira (*Psidium guajava* L.). *Revista Ciência Agronômica* 37: 216-220.

- Aizen, M.A.; Garibaldi, L.A.; Cunningham, S.A.; Klein, A.M. (2009) How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of Botany* 103: 1579-1588.
- Armstrong, J.A. (1979) Biotic pollination mechanisms in the Australian flora - A review. *New Zealand Journal of Botany* 17: 467-508.
- Barth, O.M.; Barbosa, A.F. (1972) Catálogo sistemático dos pólenes das plantas arbóreas do Brasil meridional XV. Myrtaceae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 70:467-495.
- Bawa, K.S. (1974) Breeding Systems of Tree Species of a Lowland Tropical Community. *Evolution* 28: 85-92.
- Bawa, K.S.; Perry, D.R.; Beach, J.H. (1985) Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. 1. Sexual systems and self-incompatibility mechanism. *Am. J. Bot.* 72: 31-45.
- Beardsell, D.V.; O'Brien, S.P.; Williams, E.G.; Knox, R.B; Calder, D.M. (1993) Reproductive biology of Australian Myrtaceae. *Australian Journal of Botany* 41: 511-526.
- Becher, M.A.; Osborne, J.L.; Thorbek, P.; Kennedy, P.J.; Grimm, V. (2013) Towards a systems approach for understanding honeybee decline: a stocktaking and synthesis of existing models. *Journal of Applied Ecology* 50: 868-880.
- Berry, R.P.; Wcislo, W.T.; Warrant, E.J. (2011) Ocellar adaptations for dim light vision in a nocturnal bee. *The Journal of Experimental Biology* 214, 1283-1293.
- Bertin, R.I.; Barnes, C.; Guttman, S.I. (1989) Selfsterility and cryptic self-fertility in *Campsis radicans* (Bignoniaceae). *Botanical Gazette* 150: 397-403.
- Biesmeijer, J.C.; Roberts, S.P.M.; Reemer, M.; Ohlemuller, R.; Edwards, M.; Peeters, T.; Schaffers, A.P.; Potts, S.G.; Kleukers, R.; Thomas, C.D.; Settele, J.; Kunin, W.E. (2006) Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313: 351-354.
- Bosch, J.; Kemp, W. (2001) How to manage the Blue Orchard bee. Sustainable Agriculture Network, Beltsville, MD.
- Bos, M.M.; Veddeler, D.; Bogdanski, A.K.; Klein, A.M.; Tschardtke, T.; Steffan-Dewenter, I.; Tylianakis, J.M. (2007) Caveats to quantifying ecosystem services: fruit abortion blurs benefits from crop pollination. *Ecological Applications*, 17, 1841–1849.

- Brittain, C.; Williams, N.; Kremen, C.; Klein, A.M. (2013) Synergistic effects of non-*Apis* bees and honeybees for pollination services. *Proceedings of the Royal Society B* 280: 20122767.
- Camillo, E. (2003) Polinização do Maracujá. Ribeirão Preto, Holo Editora. Pp 44.
- Carneiro, L.T.; Martins, C.F. (2012) Africanized honey bees pollinate and preempt the pollen of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) flowers. *Apidologie* 43: 474-486.
- Charlesworth, D. (1989) Evolution of low female fertility in plants: Pollen limitation, resource allocation and genetic load. *Tree* 4: 289-292.
- Cordeiro, G.D.; Alves-dos-Santos, I. (2008) Biologia de nidificação em *Hylaeus* (Colletidae). *Anais do VIII Encontro sobre Abelhas*. Ribeirão Preto. Pp. 192–197.
- Costanza, R.; d’Arge, R.; de Groot, R.S.; Farber, S.; Grasso, M.; Hannon, B.; Limburg, K.; Naeem, S.; O’Neill, R.V.; Paruelo, J.; Raskin, R.G.; Sutton, P.; van den Belt, M. (1997) The value of the world’s ecosystem services and natural capital. *Nature* 387: 253-260.
- Crome, F.H.; Irvine, A.K. (1986). Two bob each way: the pollination breeding system of the Australian rainforest tree *Syzygium cormiflorum* (Myrtaceae). *Biotropica* 18: 115–125.
- Cruden, R.W. (1977) Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.
- Cunningham, S.A. (2000) What determines the number of seed produced in a flowering event? A case study of *Calyptranthes ghiesbreghtiana* (Arecaceae). *Australian Journal of botany* 48: 659-665.
- Dafni, A.; Kevan, P.G.; Husband, B.C. (2005) *Practical Pollination Biology*. Ontario, Canada.
- Dafni, A.; Maués, M.M. (1998) A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. *Sexual Plant Reproduction* 11:117-180.
- Dobson, H.E.M. (1987) Role of flower and pollen aromas in host-plant recognition by solitary bees. *Oecologia* 72: 618-623.
- Endress, P.K. (1994) *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Erdtman, G. (1966) *Pollen morphology and plant taxonomic*. Stockholm: Almqvist & Wilsell.

- Faegri, K.; Van Der Pijl. (1971) The principles of pollination ecology. Oxford: Pergamon Press.
- Frankie, G.W.; Haber, W.W.; Opler, P.A.; Bawa, K.S. (1983) Characteristics and organization of the large bee pollination system in the Costa Rican dry forest, p. 441-448. In C. E. Jones & R. J. Little (eds.), Handbook of experimental pollination biology. New York, Scientific and Academic Editions, 558p.
- Freitas, B.M.; Alves, J.E. (2008) Efeito do número de visitas florais da abelha melífera (*Apis mellifera* L.) na polinização da goiabeira (*Psidium guajava* L.) cv. Paluma. Revista Ciência. Agrônômica. 39: 148-154.
- Freitas, B.M.; Oliveira-Filho, J.H. (2003) Rational nesting box to carpenter bees (*Xylocopa frontalis*) in the pollination of passionfruit (*Passiflora edulis*). Ciência Rural 33: 1135-1139.
- Gibbs, P.E.; Bianchi, M. (1993) Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with Late-acting self-incompatibility. Botanica Acta 106: 64-71.
- Garibaldi, L.A.; et al. (2013) Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. Science 339: 1608-1610.
- Giannini, T.C.; Boff, S.; Cordeiro, G.D.; Cartolano Jr., E.A.; Veiga, A.K.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Saraiva, A.M. (2015) Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. Apidologie 46: 209-223.
- Greenleaf, S.S.; Kremen, C. (2006) Wild bees enhance honey bees' pollination of hybrid sunflower. PNAS 103: 13890-13895.
- Greiner, B.; Ribi, W.A.; Warrant, E.J. (2004a). Retinal and optical adaptations for nocturnal vision in the halictid bee *Megalopta genalis*. Cell Tissue Research 316: 377-390.
- Greiner, B.; Ribi, W.A.; Wcislo, W.T.; Warrant, E.J. (2004b). Neural organization in the first optic ganglion of the nocturnal bee *Megalopta genalis*. Cell Tissue Research 318: 429-437.
- Gressler, E.; Pizo, M.A.; Morellato, L.P.C. (2006) Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. Revista Brasileira de Botânica 29: 509-530.
- Hopper, S.D. (1980) Bird and mammal pollen vectors in *Banksia* communities at Cheyne Beach, Western Australia. Aust. J. Bot. 28: 61-75.

- Jander, U.; Jander, R. (2002) Allometry and resolution of bee eyes (Apoidea). *Arthropod Structure and Development* 30: 179-193.
- Janzen, D.H. (1968) Notes on nesting and foraging behaviour of *Megalopta* (Hymenoptera: Halictidae) in Costa Rica. *Journal of the Kansas Entomological Society* 41: 342-350.
- Johnson, L.A.S.; Briggs, B.G. (1984) Myrtales and Myrtaceae—a phylogenetic analysis. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 71: 700-756.
- Kawasaki, M.L.; Landrum, L.R. (1997) A rare and potentially economic fruit of Brazil. Cambuci, *Campomanesia phaeaa* (Myrtaceae). *Economic Botany* 51: 403-407.
- King, C.; Ballantyne, G.; Willmer, P.G. (2013) Why flower visitation is a poor proxy for pollination: measuring single-visit pollen deposition, with implications for pollination networks and conservation. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 811–818.
- Klein, A.M.; Vaissière, B.E.; Cane, J.H.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S.A.; Kremen, C.; Tscharntke, T. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B* 274: 303-313.
- Köppen, W. (1948) *Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra*. Fondo de Cultura Económica. México. 479p.
- Korbecka, G.; Klinkhamer, P.G.L.; Vrieling, K. (2002) Selective embryo abortion hypothesis revisited – a molecular approach. *Plant Biology* 4: 298-310.
- Lughadha, E.N.; Proença, C. (1996) A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 83: 480-503.
- Magalhães, C.B.; Freitas, B.M. (2013) Introducing nests of the oil-collecting bee *Centris analis* (Hymenoptera: Apidae: Centridini) for pollination of acerola (*Malpighia emarginata*) increases yield. *Apidologie* 44: 234-239.
- Malerbo, D.T.S.; Toledo, V.A.A.; Couto, R.H.N. (1991) Polinização entomófila em jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.). *Ciência Zootécnica - Jaboticabal* 6:3-5.
- Martin, F.W. (1959) Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* 34: 125-128.
- Maués, M.M.; Couturier, G. (2002) Biologia floral e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no Estado do Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 441-448.

- Mayfield, M.; Waser, N.M.; Price, M. (2001). Exploring the 'Most effective pollinator principle' with complex flowers: bumblebees and *Ipomopsis aggregata*. *Annals of Botany* 88: 591–596.
- Michener, C.D. (1965) A classification of the bees of the Australian and Pacific Regions. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 130:1-362.
- Michener, C.D. (2007) *The bees of the world*. Johns Hopkins Univ. Press. Baltimore & London.
- Ne'eman, G.; Jurgens, A.; Newstrom-Lloyd, L.; Potts, S.G.; Dafni, A. (2010) A framework for comparing pollinator performance: effectiveness and efficiency. *Biological Reviews* 85: 435–451.
- Ollerton, J.; Winfree, R.; Tarrant, S. (2011) How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321-326.
- Oliveira-Abreu, C; Hilário, S.D.; Luz, C.F.P.; Alves-dos-Santos, I. (2014) Pollen and nectar foraging by *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in natural habitat. *Sociobiology* 4: 441-448.
- Oliveira, R.; Schlindwein, C. (2009) Searching for a manageable pollinator for acerola orchards: the solitary oil-collecting bee *Centris analis* (Hymenoptera: Apidae: Centridini). *Journal Economic Entomology* 102: 265-273.
- Olsen, K.M. (1997) Pollination effectiveness and pollinator importance in a population of *Heterotheca subaxillaris* (Asteraceae). *Oecologia* 10: 114–121.
- Petanidou, T.; Potts, S.G. (2006) Mutual use of resources in Mediterranean plant-pollinator communities: how specialized are pollination webs? *Plant-Pollinator Interactions: from Specialization to Generalization* (eds N.M. Waser & J.Ollerton), pp. 220–244. University of Chicago Press, Chicago.
- Pitts-Singer, T.L.; Cane, J.H. (2011) The alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata*: the world's most intensively managed solitary bee. *Annual Review Entomology*: 221-237.
- Popic, T.J.; Wardle, G.M.; Davila, Y.C. (2013) Flower-visitor networks only partially predict the function of pollen transport by bees. *Austral Ecology* 38: 76-86.
- Primack, R.B.; Silander, J.A. (1975) Measuring relative importance of different pollinators to plants. *Nature* 255: 143-144.
- Proença, C.E.B. (1992) Buzz pollination - older and more widespread than we think? *Journal of Tropical Ecology* 8:115-120.

- Proença, C.E.B.; Gibbs, P.E. (1994) Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brasil. *New Phytologist* 126:343-354.
- Radford, A.E.; Dickison, W.C.; Massey, J.R.; Bell, C.R. (1974) Vascular plant systematics. New York: Harper & Row.
- Ramalho, M.; Kleinert, A.M.P; Imperatriz-Fonseca, V.L. (1990) Important bee plants for stingless bees (*Melipona* and *Trigonini*) and africanized honeybees (*Apis mellifera*) in neotropical habitats: a review. *Apidologie* 21:469-488.
- Ricketts, T.H.; Regetz, J.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S.A.; Kremen C.; *et al.* (2008) Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecology Letters* 11: 499–515.
- Roitman, G.G.; Montaldo, N.H.; Medan, D. (1997) Pollination biology of *Myrrhinium atropurpureum* (Myrtaceae): Sweet, flesh petals attract frugivorous birds. *Biotropica* 29: 162-168.
- Roubik, D.W. (1989) Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge University Press, Cambridge
- Rozen, J.G. (1984) Nesting biology of Diphaglossine bees (Hymenoptera: Colletidae), *Am. Mus. Novit.* 2786, 1–33.
- Santos, L.M.; Tierney, S.M.; Wcislo, W.T. (2010) Nest descriptions of *Megalopta aegis* (Vachal) and *M. guimaraesi* Santos & Silveira (Hymenoptera, Halictidae) from the Brazilian Cerrado. *Revista Brasileira de Entomologia* 54: 332-334.
- Schifino-Wittmann, M.T.; Dall’agnol, M. (2002) Auto-incompatibilidade em plantas. *Ciência Rural* 32: 1083-1090.
- Souza, M.A.D. (1996) Biologia reprodutiva de onze espécies de Myrtaceae em floresta de terra firme na Amazônia Central. Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 74 pp.
- Torenzan-Silingardi, H.M.; Del-Claro, K. (1998) Behavior of visitors and reproductive biology of *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae) in cerrado vegetation. *Ciência e Cultura* 50: 281-284.
- Vallilo, M.I; Garbelotti, M.L.; Oliveira, E.; Lamardo, L.C.A. (2005) Características físicas e químicas dos frutos do Cambucizeiro (*Campomanesia phaea*) *Revista Brasileira de Fruticultura* 27: 241-244.

- Vilhena, A.M.G.F.; Augusto, S.C. (2007) Polinizadores da aceroleira *Malpighia emarginata* DC (Malpighiaceae) em área de Cerrado no Triângulo Mineiro. Uberlândia. Bioscience Journal 23(1): 14-23.
- Warrant, E.J.; Kelber, A.; Gisle'N, A.; Greiner, B.; Ribi, W.; Wcislo, W.T. (2004) Nocturnal vision and landmark orientation in a tropical halictid bee. Current Biology 14: 1309-1318.
- Warrant, E.J.; Porombka, T.; Kirchner, W.H. (1996). Neural image enhancement allows honey bees to see at night. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 263: 1521–1526.
- Wcislo, W.T.; Arneson, L.; Roesch, K.; Gonzalez, V.; Smith, A.; Fernández, H. (2004) The evolution of nocturnal behavior in sweat bees, *Megalopta genalis* and *M. ecuadoria* (Hymenoptera: Halictidae): an escape from competitors and enemies? Biological Journal Linnean Society 83: 377-387.
- Wcislo, W.T.; Tierney, S.M. (2009) Behavioural environments and niche construction: the evolution of dim-light foraging in bees. Biological Reviews 84: 19-37.
- Whitaker, A.H. (1987) The roles of lizards in New Zealand plant reproductive strategies. New Zealand Journal of Botany 25: 315-328
- Wiens, D. (1984) Ovule survivorship, brood size, life story, breeding systems, and reproductive success in plants. Oecologia 64: 47-53.
- Wiens, D.; Calvin, C.L.; Wilson, C.A.; Davern, C.I.; Frank, D.; Seavey, S.R. (1987) Reproductive success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. Oecologia 71: 501-509.
- Wilms, W. (1995) Die Bienenfauna im Küstenregenwald Brasiliens und ihre Beziehungen zu Blütenpflanzen: Fallstudie Boracéia, São Paulo. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Wilms, W.; Wiechers, B. (1997) Floral resource partitioning between native *Melipona* bees and introduced Africanized honey bee in the Brazilian Atlantic rain Forest. Apidologie 28: 339-355.

Capítulo 3

Os voláteis florais de *Campomanesia phaea* (Myrtaceae) e os efeitos no comportamento de seus polinizadores noturnos e crepusculares

Capítulo 3 - Os voláteis florais de *Campomanesia phaea* (Myrtaceae) e os efeitos no comportamento de seus polinizadores noturnos e crepusculares

RESUMO

O cambuci (*Campomanesia phaea*) têm as abelhas noturnas e crepusculares como os polinizadores mais eficientes. Estas abelhas possuem visão adaptada para voarem a noite e encontrar as flores e os ninhos. Os voláteis emitidos a noite pelas flores provavelmente também são muito importantes para guiar estas abelhas. Os objetivos deste estudo foram: i) analisar os voláteis emitidos pelas flores de *C. phaea* às 5h (sem luz) e às 10h; ii) testar a percepção e atração das abelhas noturnas/crepusculares aos compostos mais abundantes emitidos pelas flores de *C. phaea*. Os voláteis florais foram coletados pelo método de *dynamic headspace* e analisados por GC-MS. Após a identificação dos voláteis emitidos pelas flores de *C. phaea*, uma mistura sintética destes compostos foi preparada para ser utilizada no teste GC-EAD com *Apis mellifera* e nos biotestes na estufa e na natureza. Foram identificados 14 compostos emitidos pelas flores de *C. phaea*, e estes são os mesmos a noite e ao dia. Porém a emissão noturna de voláteis é maior e alguns compostos são mais eminentes a noite (1-Octanol) e outros ao dia (2-Phenylethanol). *Apis mellifera* respondeu aos voláteis no teste GC-EAD e no bioteste na estufa. Na natureza as abelhas noturnas/crepusculares foram atraídas aos compostos oferecidos. Os resultados apontam que o buque floral de *C. phaea* emitido durante a noite tem função atrativa para as abelhas noturnas/crepusculares, além do que sugerem que 1-Octanol pode ser o volátil floral chave nesta atração.

INTRODUÇÃO

Para a interação entre uma planta e uma abelha ocorrer, sinais florais são essenciais e são oferecidos pelas flores por meio de estruturas de sinalização olfativas e visuais (Dressler 1982, Dobson 1987, Lunau 1991, Whitney *et al.* 2009, Dötterl &

Vereecken 2010). Como os odores florais atuam na atratividade dos polinizadores, estes são muitas vezes importantes na reprodução das flores (Raguso 2004).

Abelhas são tipicamente diurnas, embora alguns grupos são noturnos e voam antes do nascer do sol e após o pôr do sol (Warrant *et al.* 2004, Wcislo & Tierney 2009). O fato de explorar os recursos a noite ou no crepúsculo pode ser vantajoso para as abelhas, pois evitam competidores nas flores e minimizam ações dos inimigos como predadores e parasitas em seus ninhos (Kerfoot 1967, Wcislo *et al.* 2004). O hábito noturno evoluiu independentemente várias vezes nas abelhas e espécies noturnas são encontradas em 4 famílias: Apidae, Andrenidae, Colletidae e Halictidae (Wcislo *et al.* 2004).

Para as abelhas noturnas voarem a noite uma visão adaptada para pouca luz se faz necessária. Para isso elas possuem adaptações morfológicas e fisiológicas para encontrar as flores e os ninhos, como maior sensibilidade dos olhos compostos e os ocelos, que são maiores do que em abelhas diurnas (Kerfoot 1967, Jander & Jander 2002, Greiner *et al.* 2004a,b, Warrant *et al.* 2004, Berry *et al.* 2011). Além de sinais florais visuais, os sinais olfatórios são provavelmente muito importantes para voos noturnos. Estudos demonstraram que voláteis florais podem atuar na atração de abelhas noturnas (Campos *et al.* 1989, Carvalho *et al.* 2012, Knoll & Santos 2012).

Logo que as flores de *C. phaea* abrem são intensamente visitadas pelas seguintes espécies de abelhas: *Megalopta sodalis*, *Megommation insigne*, *Ptiloglossa latealcarata* e *Zikanapis seabrai*, que são tipicamente noturnas/crepusculares. Entre 5:30 h e 6 h, *Apis mellifera* começa a visitar as flores de *C. phaea*. No Capítulo 2 foi verificado que estas espécies são os polinizadores mais eficientes de *C. phaea*.

Os objetivos deste estudo foram: i) analisar os voláteis emitidos pelas flores de *C. phaea* em diferentes períodos às 5 h, quando a atividade de abelhas noturnas/crepusculares é alta e às 10 h, quando os visitantes florais diurnos estão ativos; ii) testar a percepção e atração das abelhas noturnas/crepusculares aos compostos emitidos pelas flores de *C. phaea*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Áreas de estudo

O estudo foi realizado em duas áreas no município de Mogi das Cruzes, Estado de São Paulo, em uma área de cultivo comercial e uma área de ocorrência natural. A área de cultivo comercial localiza-se no Sítio Cambuci Nativa (23°25'S / 46°10'W). A área de ocorrência natural localiza-se no Parque das Neblinas (23°45'S / 46°09'W). As duas áreas estão sob o Domínio de Mata Atlântica e o clima é do tipo Af (Köppen 1948), caracterizado como tropical constantemente úmido com mais de 2000 mm de pluviosidade anual, sem sazonalidade definida. As altitudes variam de 700 a 1100 m.

As amostras dos voláteis florais de *C. phaea* coletadas no Brasil foram analisadas na Universidade de Salzburg (Áustria) durante estágio realizado no exterior (BEPE – Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior, 2013/26599-6, FAPESP).

Amostras dos voláteis florais

As amostras dos voláteis florais de *C. phaea* foram coletadas na área de cultivo comercial em dezembro de 2013 (Figura 1). Para a coleta dos voláteis florais foi utilizado o método de *dynamic headspace* conforme Dötterl *et al.* (2005 a,b) em cinco indivíduos de *C. phaea*. Para verificar como a emissão de voláteis varia ao longo da duração da flor, a mesma flor foi amostrada duas vezes: imediatamente no início da antese (às 5h, antes do nascer do sol) e cinco horas após a antese (às 10 h no pico de atividades das abelhas diurnas). Para obter os voláteis, as flores de *C. phaea* foram ensacadas com plástico poliéster (Toppits®) por 2 minutos e depois tubos adsorventes (“*minitraps*”) foram inseridos por mais 2 minutos para sugar os voláteis usando uma bomba de sucção (G12/01 EB; Rietschle Thomas, Puchheim, Alemanha). Os tubos adsorventes (frascos de quartzo, comprimento: 25 mm, diametro: 2 mm) foram preparados com 1,5 mg de Tenax-TA (malha 60-80; Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA) e 1,5 mg Carbotrap B (malha 20-40, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA). Os adsorventes foram fixados nos tubos com malha de lã de vidro. Amostras de folhas de *C. phaea* foram coletadas com o mesmo método para diferenciação entre os compostos emitidos pelas partes vegetativas e florais.

Figura 1. (A) (B) Método de *dynamic headspace* para coleta dos voláteis florais de *Campomanesia phaea*, com flores ensacadas preparadas para a instalação da bomba de sucção. (C) (D) Professor Stefan Dötterl durante sua visita ao Brasil na área de cultivo do cambuci, as imagens ilustram o momento de coleta dos voláteis florais.

As amostras dos voláteis florais de *C. phaea* coletadas no Brasil foram analisadas na Universidade de Salzburg (Áustria) no laboratório do Prof. Stefan Dötterl. O método utilizado para a análise dos voláteis foi de GC-MS (cromatografia gasosa – espectrômetro de massa) que determinou os compostos emitidos pelas flores de *C. phaea* nas respectivas proporções. O sistema GC consiste de um gás cromatógrafo automatizado de dessorção térmica (modelo TD-20, Shimadzu, Japan acoplado com modelo QP2010 Ultra EI, Shimadzu, Japan) equipado com uma coluna de sílica ZB-5 (5% *phenyl polysiloxane*; comprimento: 60 m, diâmetro 0.25 mm; Phenomenex). A coluna tem vazão (gás transmissor: hélio) de 1.5 ml/min. A temperatura do GC começa em 40°C, depois aumenta 6°C por minuto até 250°C. A interface MS trabalha em 250°C. O espectrômetro de massa (MS) foi feito a 70 eV (EI mode) de m/z 30 a 350. Os dados do GC-MS foram processados usando o pacote GCMSolution, Versão 2.72 (Shimadzu Corporation 2012). A identificação dos compostos foi por meio da biblioteca de referência “*mass spectral libraries* Wiley 9, Nist 2011, FFNSC 2” e também pelo banco de dados disponíveis no MassFinder 3. Alguns compostos foram confirmados por

comparação do espectrômetro de massa e tempo de retenção com compostos padrão autênticos.

Após a identificação dos voláteis emitidos pelas flores de *C. phaea*, uma mistura sintética destes compostos foi preparada, usando as porcentagens de cada um deles encontradas nas amostras, para obter um odor sintético que foi utilizado no eletro-antenograma e biotestes.

Eletro-antenograma (GC-EAD)

O GC-EAD (cromatografia gasosa – detecção eletroantenográfica) foi realizado na Universidade de Salzburg, para avaliar a percepção de *Apis mellifera* para a mistura sintética dos voláteis da flor de *C. phaea*. O eletro-antenograma avalia a percepção na antena para cada composto químico (Dötterl *et al.* 2005a).

O sistema do GC-EAD consiste de um gás cromatógrafo (Agilent 7890A, Santa Clara, California, USA) equipado com chama detectora de ionização “*flame ionization detector*” (FID) e um EAD “*electroantennographic detection*” (heated transfer line, 2-channel USB acquisition controller) fornecido por Syntech (Kirchzarten, Germany). Um volume de 1 µl da mistura sintética foi injetada (temperatura do injetor: 250°C) com a temperatura do forno a 40°C, seguido pela abertura depois de 0,5 minuto e aquecendo o forno na taxa de 10°C por minuto até 220°C. O sistema foi equipado com uma coluna de sílica ZB-5 (5% *phenyl polysiloxane*; comprimento: 30 m, diâmetro: 0.32 mm; Phenomenex). A coluna tem vazão (gás transmissor: hidrogênio) de 3 ml/min e é aberta no final por um *µFlow splitter* (Gerstel, Mülheim, Germany) ligados a dois capilares levando ao FID (2 m x 0,15 µm) e ao EAD (1 m x 0,2 µm). Gás N₂ foi introduzido no *splitter* com 25 ml/min. O fluxo de ar da saída do EAD foi direcionado diretamente para a antena da abelha.

Para o GC-EAD, 16 antenas de oito indivíduos de *A. mellifera* foram cortadas na base e na ponta, e inseridas entre dois eletrodos, os quais foram completados com a solução *insect ringer* (8,0 g/l NaCl, 0,4 g/l KCl, 0,4 g/l CaCl₂) e conectados a fios de prata como descrito em Dötterl *et al.* (2005b).

Bioteste em estufa com *Apis mellifera*

Biotestes foram realizados em maio de 2014 em “casa de vegetação” (8 x 4 x 2,2 m, construída de madeira e fechada com tela branca) no Jardim Botânico da

Universidade de Salzburg (Figura 2A), na qual abrigava uma colmeia de *Apis mellifera* (Figura 2B). Flores de *Helianthus annuus*, *Ranunculus acris*, *Fagopyrum esculentum*, *Reseda alba* (Figura 2C) e alimentadores foram oferecidos para as abelhas como recursos alimentares (Figura 2D). Nos alimentadores foram colocados xarope de açúcar (Apiinvert®). Antes de começar os biotestes as plantas floridas foram removidas da estufa.

Os biotestes na estufa com *Apis mellifera* foram realizados de duas maneiras: (1) foi oferecido o odor sintético de *C. phaea* para as abelhas sem treinamento; (2) foi oferecido o odor sintético de *C. phaea* para as abelhas após um prévio treinamento. O odor sintético de *C. phaea* foi diluído em óleo de parafina na proporção de 10^{-3} . O treinamento consistiu em oferecer para as abelhas por 60 minutos os alimentadores em uma distância de 20 cm de um a outro (Figura 2E). Um desses alimentadores continha xarope de açúcar + um papel filtro com 10 µl do odor sintético de *C. phaea*. O outro alimentador não continha o xarope de açúcar nem o odor sintético, embora, um papel filtro foi colocado no alimentador provendo para as abelhas as mesmas pistas visuais. Depois do período de treinamento os alimentadores foram removidos, e o bioteste foi iniciado. Assim, foram oferecidos para as abelhas duas placas de Petri com diferentes tratamentos nos papéis filtros. Um papel filtro continha 10 µl do odor sintético de *C. phaea* + 10 µl de óleo de parafina (para evitar rápida evaporação), e o outro com 10 µl de acetona + 10 µl de óleo de parafina (controle negativo). Durante cinco minutos as abelhas que pousaram na placa de Petri foram coletadas e logo após as posições das placas foram trocadas para coletar as abelhas por mais cinco minutos. Para evitar que as mesmas abelhas sejam contadas por mais de uma vez, todas as abelhas que mostraram resposta positiva foram coletadas e acondicionadas em recipientes resfriados (geladeira portátil) por alguns minutos, evitando assim a contagem do mesmo indivíduo. Depois de registradas, as mesmas foram soltas. Os biotestes foram conduzidos entre às 9h e 17h, quando as abelhas estavam em maior atividade dentro da estufa.

Figura 2. Estufa (casa de vegetação) no Jardim Botânico da Universidade de Salzburg (A), com colmeia de *Apis mellifera* (B), flores (C) e alimentadores (D) oferecidos para as abelhas. Fase de treinamento do bioteste (E) e disposição das placas de Petri no momento do bioteste (F).

Bioteste na natureza

Os biotestes na natureza foram conduzidos nas duas áreas de estudo duas vezes por semana entre setembro de 2014 a janeiro de 2015, assim acrescentando um mês antes e um mês depois do período de floração de *C. phaea*. Foram realizados os seguintes tratamentos: odor sintético da flor de *C. phaea* (puro, com diluição em óleo de parafina de 10^{-3} e 10^{-5}); compostos mais abundantes emitidos pela flor de *C. phaea* (1-Hexanol e 1-Octanol, 2-Phenylethanol e Benzyl alcohol); controle positivo (Linalol); controle negativo (Óleo de parafina). Para cada um destes tratamentos foram oferecidos 20 μ l e 100 μ l em papel filtro alojados em placa de Petri e 500 μ l em chumaço de algodão amarrado com barbante e pendurado nas árvores. Em todos os biotestes, entre setembro de 2014 a janeiro de 2015 (30 horas em 30 dias), foram oferecidos os volumes

de 20 µl e 100 µl. Entre dezembro de 2014 e janeiro de 2015 (6 horas em 6 dias) foi ofertado o volume de 500 µl para os tratamentos. Abelhas que responderam positivamente e pousaram nas placas de Petri ou voaram ao redor do chumaço de algodão foram coletadas para identificação, acondicionadas em recipientes resfriados (geladeira portátil) por alguns minutos, evitando assim a contagem do mesmo indivíduo. Depois de registradas, as mesmas foram soltas. Os biotestes ao ar livre foram realizados durante o horário de atividade das abelhas noturnas (entre 5 h e 6 h) em condições climáticas propícias.

Análise dos dados

Para as análises semi-quantitativas (porcentagem da contribuição de cada composto no total de voláteis emitidos) das diferenças na emissão de voláteis entre as classes de tempo (noite e dia), foi realizado o teste de PERMANOVA (fator: *time class*, 10.000 permutações) baseado na similaridade de *Bray–Curtis* (Primer 6 Version 6.1.15 & Permanova Version 1.0.5). Além disso, o teste de *two-way* SIMPER (fator: *time class*) foi utilizado para determinar os compostos responsáveis pelas diferenças semi-quantitativas nas classes de tempo (Clarke & Gorley 2006; Primer 6 Version 6.1.15 & Permanova Version 1.0.5). Para comparar as diferenças na quantidade relativa dos mais variáveis compostos entre as classes de tempo foi usado o teste de Wilcoxon foi realizado (Past Version 1.0 software; Hammer *et al.* 2001). Os resultados dos biotestes foram analisados pelo teste binominal *goodness-of-fit* usando a planilha disponibilizada por <http://udel.edu/~mcdonald/statexactbin.html> (acessado em 20 de dezembro de 2014).

RESULTADOS

Amostra de voláteis das flores de *C. phaea*

Nas amostras dos voláteis florais de *C. phaea* foram identificados 14 compostos pertencendo a quatro classes, e estes foram os mesmos nas amostras noturnas e diurnas: alifáticos (10 compostos), aromáticos (2 compostos), monoterpenos (1 composto) e compostos *N-bearing* (1 composto) (Tabela 1). Seis compostos representaram 97,3% do

total dos voláteis emitidos: 1-Hexanol (39,9%), 1-Octanol (30,3%), 2-Phenylethanol (13,1%), Benzyl alcohol (6,3%), (Z)-3-Hexen-1-ol (4,3%) e Hexanal (3,4%).

Embora as flores de *C. phaea* emitam os mesmos compostos a noite e ao dia, a composição relativa difere entre estes dois períodos (PERMANOVA: Pseudo- $F_{1,14,02}$; $p=0,007$) (Figura 3). A análise de SIMPER revelou quais compostos foram responsáveis pelas diferenças observadas entre as amostras noturnas e diurnas: dois compostos contribuíram juntos por 56% das diferenças entre as amostras noturnas e diurnas. 1-Octanol foi o composto mais variável e representou 31% das diferenças e 2-Phenylethanol foi responsável por 25% das diferenças observadas. A quantidade de 1-Octanol foi significante maior nas amostras noturnas (Wilcoxon: $p=0,04$), mas 2-Phenylethanol não diferiu entre as amostras noturnas e diurnas ($p=0,22$).

Tabela 1. Quantidade relativa dos compostos emitidos pelas flores de *C. phaea* em amostras noturnas e diurnas. Os compostos estão listados de acordo com a classe química. KRI: Kovats Retention Index (Índice de retenção).

Quantidade total de odor (ng/hora/flor)		Noite	Dia
		Média (min/max) 1648 (886/2788)	Média (min/max) 829 (540/1096)
Compostos	KRI		
Alifáticos			
Hexanal	802	1,73 (0,91/2,20)	8,44 (1,94/6,88)
(Z)-3-Hexen-1-ol	856	3,86 (1,69/9,45)	5,99 (1,67/5,23)
1-Hexanol	868	43,26 (31,05/91,47)	32,81 (12,13/27,06)
2-Heptanol	899	1,39 (0,46/3,87)	1,17 (0,44/0,52)
Hexyl acetate	1013	0,63 (0,43/1,02)	0,78 (0,15/1,20)
1-Octanol	1072	38,46 (24,60/61,70)	15,80 (2,50/16,03)
Octyl acetate	1211	0,11 (0,10/0,13)	0,24 (0,10/0,20)
Octyl formate	1130	0,14 (0,06/0,23)	0,47 (0,08/0,62)
Hexyl butyrate	1192	0,27 (0,35/0,38)	0,70 (0,37/0,37)
Hexyl hexanoate	1388	0,06 (0,05/0,05)	-
Aromáticos			
Benzyl alcohol	1039	4,13 (0,82/15,75)	12,81 (3,75/9,21)
2-Phenylethanol	1121	6,59 (3,46/13,09)	24,95 (5,67/29,66)
Monoterpenos			
Linalool	1100	0,34 (0,26/0,54)	1,62 (0,62/1,37)
N-bearing			
Indole	1144	0,06 (0,07/1,14)	0,30 (0,04/0,25)

Figura 3. Escala bidimensional da emissão de odor floral nos dois períodos analisados (*time classes*) a partir das similaridades de *Bray–Curtis*, as quais foram construídas com base na quantidade relativa de compostos emitidos.

Eletro-antenograma (GC-EAD)

As antenas de *Apis mellifera* responderam positivamente para cinco dos seis compostos testados: (Z)-3-Hexen-1-ol, 1-Hexanol, Benzyl alcohol, 1-Octanol, e 2-Phenylethanol. Não foram observadas respostas em direção a Hexanal (Figura 4).

Figura 4. Detecção eletroantenográfica de *Apis mellifera* (EAD - linha azul) aos compostos: **a.** Hexanal; **b.** (Z)-3-Hexen-1-ol; **c.** 1-Hexanol; **d.** Benzyl alcohol; **e.** 1-Octanol; **f.** 2-Phenylethanol. * Artefato.

Bioteste em estufa com *Apis mellifera*

Apis mellifera não respondeu espontaneamente (sem treinamento) para o odor sintético das flores de *C. phaea*. Após o treinamento, as abelhas foram atraídas ao odor. Trinta e duas abelhas exibiram respostas positivas pousando na placa com o odor sintético durante os primeiros cinco minutos oferecidos. As abelhas não pousaram na placa controle ($p < 0,001$). A posição das placas foi mudada, e 31 abelhas pousaram na placa com o odor sintético e novamente as abelhas não pousaram na placa controle ($p < 0,001$) (Figura 5).

Figura 5. Bioteste com odor sintético de *C. phaea* vs. controle, com *Apis mellifera*, realizado no Jardim Botânico na Universidade de Salzburg. Em determinado momento do teste as posições das placas foram invertidas.

Bioteste na natureza

Duas espécies de abelhas noturnas/crepusculares responderam positivamente nos biotestes realizados na área de cultivo. *Megommation insigne* e *Ptiloglossa latealcarata* foram atraídas pelos odores sintético da flor do cambuci e pelo composto 1-Octanol (Tabela 2). Estas abelhas apenas foram atraídas quando foi oferecido o volume de 500 μ l. Os tratamentos com os volumes de 20 μ l e 100 μ l não obtiveram respostas positivas. Houve diferença significativa entre o número total de abelhas atraídas pelos tratamentos em relação aos controles ($p < 0,001$). As abelhas não foram atraídas na área de ocorrência natural de *C. phaea*.

Tabela 2. Número de indivíduos das espécies de abelhas atraídas pelos compostos oferecidos no bioteste ao ar livre com volume de 500 µl. OSFC: odor sintético da flor do cambuci, CP: controle positivo (Linalol), CN: controle negativo (óleo de parafina).

	OSFC puro	OSFC 10 ⁻³	OSFC 10 ⁻⁵	1-Hexanol	1-Octanol	2-Phenylethanol	Benzyl alcohol	CP	CN
<i>Megommation insigne</i>	8	4	2		2				
<i>Ptiloglossa latecalcarata</i>	4	6			2				

DISCUSSÃO

Os compostos identificados na emissão das flores de *C. phaea* são comuns na variedade de voláteis emitidos pelas flores de angiospermas, além de serem distribuídos em famílias não correlacionadas (Knudsen *et al.* 2006). O fato de *C. phaea* emitir voláteis comuns pode ter contribuído na atração de um espectro generalista de seus visitantes florais (Capítulo 2).

Os nossos resultados mostraram que as flores de *C. phaea* emitem os mesmos compostos a noite e ao dia, porém a emissão de voláteis emitidos durante a noite é maior. Este maior investimento da planta a noite sugere que o odor floral exerce um papel de atrair as abelhas noturnas/crepusculares polinizadoras de *C. phaea*. Sabe-se que o odor junto com outros traços florais está envolvido na preferência de visitantes florais (Baker 1961, Knudsen & Tollsten 1995, Dobson 2006, Dötterl & Vereecken 2010).

Apesar das flores de *C. phaea* emitirem os mesmos compostos a noite e ao dia, o padrão de emissão é diferente. Isto porque alguns compostos são mais eminentes a noite, como o 1-Octanol (noite: 38,46; dia: 15,80 ng/flor/hora) e outros ao dia como o 2-Phenylethanol (noite: 6,59; dia: 24,95 ng/flor/hora). Esta mudança na proporção dos compostos emitidos gera um odor floral diferente ao longo da antese da flor de *C. phaea*. Espécies com a mesma composição dos compostos florais, porém com mudanças em suas proporções relativas conferem alterações nas respostas dos visitantes florais (Cunningham *et al.* 2004) e até mesmo mudança no espectro das espécies que visitam as flores (Dötterl *et al.* 2005a, Dobson 2006). Outros estudos já mostraram aumento na proporção de voláteis emitidos durante a noite, em espécies de *Nicotiana*

(Solanaceae) e *Silene* (Caryophyllaceae) que são visitadas por mariposas (Loughrin *et al.* 1990, Waelti *et al.* 2007). A novidade em *C. phaea* é que a proporção dos compostos emitidos muda poucas horas depois da abertura da flor, sugerindo que a planta tem que investir em um período curto de tempo na atração dos seus polinizadores mais eficientes, as abelhas noturnas/crepusculares.

Alguns compostos têm papel fundamental na atração de polinizadores específicos, como são os casos dos voláteis emitidos por espécies de Annonaceae e Araceae que atraem os besouros escarabeíneos (Maia *et al.* 2012, Pereira *et al.* 2014) e os machos de abelhas euglossini que são atraídos pelos voláteis de Orchidaceae (Dodson *et al.* 1969, Williams 1982). Em *C. phaea*, o 1-Octanol deve ser o principal composto responsável pela atração dos polinizadores noturnos, pois este foi o composto volátil mais variável nas flores de *C. phaea* entre as amostras da noite e do dia. Porém, o 1-Octanol não é um composto específico noturno, pois também é emitido em grandes quantidades durante o dia em outras plantas (Knudsen *et al.* 2006). É o caso das orquídeas do gênero *Ophrys* que emitem este composto durante o dia e tem função de atrair as suas abelhas polinizadoras (Borg-Karlson & Tengö 1986). Melhores investigações precisam ser feitas em outras espécies de antese noturna para verificar a especificidade do 1-Octanol para atrair as abelhas noturnas.

Apis mellifera que é eficiente na polinização de *C. phaea* e visita suas flores antes do nascer do sol, mostrou claras respostas positivas aos voláteis emitidos pelas flores do cambuci. No teste GC-EAD as antenas responderam em relação aos compostos mais abundantes emitidos pelas flores de *C. phaea*. Este resultado demonstra a presença de receptores olfatórios nas antenas de *A. mellifera* para aqueles voláteis. No bioteste realizado na estufa *A. mellifera* respondeu positivamente ao odor sintético das flores de *C. phaea* oferecido após o período de treinamento. Portanto, *A. mellifera* após ganho de experiência ao odor com visitas repetitivas as flores de cambuci pode usar os voláteis emitidos para encontrar estas flores no período crepuscular. *Apis mellifera*, provavelmente por ser uma espécie generalista, precisa realizar algumas visitas nas flores para aprender o odor e recrutar as operárias para realizarem visitas frequentes (Rachensberger, Cordeiro e Dötterl, dados não publicados), ao contrário de abelhas especialistas (oligoléticas) que conseguem encontrar as flores sem prévia experiência (Dötterl *et al.* 2011, Burger *et al.* 2012, Milet-Pinheiro *et al.* 2012, Milet-Pinheiro *et al.*

2013). Embora, permanece para ser testado como abelhas encontram as flores quando as visitam pela primeira vez.

Nos biotestes ao ar livre as espécies de abelhas noturnas/crepusculares foram atraídas, evidenciando que o odor emitido pelas flores do cambuci são importantes na sua atração. Os estudos de Carvalho *et al.* (2012) e Knoll & Santos (2012) sugeriram que a atratividade de espécies de abelhas noturnas (*Megalopta* spp.) a compostos sintéticos está relacionada aos odores emitidos pelas flores que estas abelhas visitam. Os resultados dos nossos biotestes, no qual foi oferecido o real odor da flor do cambuci, comprova a hipótese previamente sugerida por estes autores.

As abelhas noturnas/crepusculares foram atraídas nos biotestes ao ar livre apenas quando foram oferecidos 500 µl dos tratamentos. Os volumes menores (20 µl e 100 µl) podem não ter atraído estas abelhas na época da florada, pois talvez estivessem competindo com as próprias flores, que por serem tão numerosas, representavam um atrativo maior.

Para concluir, a proporção dos compostos do buquê floral emitido pelas flores de *C. phaea* se altera desde o início da antese (5 h) até o momento do pico de atividades das abelhas diurnas (10 h). Os resultados apontam que a composição dos voláteis emitidos pelas flores de *C. phaea* durante a noite tem função atrativa para as abelhas noturnas/crepusculares, e sugerem que 1-Octanol pode ser o composto chave nesta atração. Portanto, o nosso estudo suporta a ideia que as abelhas noturnas/crepusculares mesmo possuindo visão adaptada para pouca luz, também utilizam os odores florais emitidos a noite para encontrar as flores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baker, H.G. (1961) The adaptation of flowering plants to nocturnal and crepuscular pollinators. *The Quarterly Review of Biology* 36: 64-73.
- Berry, R.P.; Wcislo, W.T.; Warrant, E.J. (2011) Ocellar adaptations for dim light vision in a nocturnal bee. *The Journal of Experimental Biology* 214: 1283-1293.
- Borg-Karlson, A.K.; Tengö J. (1986) Odor mimetism? Key Substances in *Ophrys lutea*-*Andrena* Pollination Relationship (Orchidaceae: Andrenidae). *Journal of Chemical Ecology* 12: 1927-1941.

- Burger, H.; Dötterl, S.; Häberlein, C.; Schulz, S.; Ayasse, M. (2012) An arthropod deterrent attracts specialised bees to their host plants. *Oecologia* 168: 727-736.
- Campos, L.A.O.; Silveira, F.A.; Oliveira, M.L.; Abrantes, C.V.M.; Morato, E.F.; Melo, G.A.R. (1989) Utilização de armadilhas para a captura de machos de Euglossini (Hymenoptera: Apoidea). *Revista Brasileira de Zoologia* 6: 621-626.
- Carvalho, A.T.; Maia, A.C.D.; Ojima, P.Y.; Santos, A.A.; Schlindwein, C. (2012) Nocturnal bees are attracted by widespread floral scents. *Journal Chemical Ecology* 38: 315-318.
- Clarke, K.R.; Gorley, R.N. (2006) *Primer v6: user manual/tutorial*. Primer-E, Plymouth, 1-91.
- Cunningham, J.P.; Moore, C.J.; Zalucki, M.P.; West, S.A. (2004) Learning, odour preference and flower foraging in moths. *The Journal of Experimental Biology* 207: 87-94.
- Dobson, H.E.M. (1987) Role of flower and pollen aromas in host-plant recognition by solitary bees. *Oecologia* 72: 618-623.
- Dobson, H.E.M. (2006) Relationship between floral fragrance and type of pollinator. In *Biology of Floral Scent*, Dudareva N, Pichersky E, (Eds). Boca Raton, FL: CRC Press pp. 147-198.
- Dodson, C.H.; Dressler, R.L.; Hills, G.H.; Adams, R.M.; Williams, N.H. (1969) Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* 164: 1243-1249.
- Dötterl, S.; Wolfe, L.M.; Jürgens, A. (2005a) Qualitative and quantitative analyses of flower scent in *Silene latifolia*. *Phytochemistry* 66: 203–213.
- Dötterl, S.; Füssel, U.; Jürgens, A.; Aas, G. (2005b) 1,4-Dimethoxybenzene, a floral scent compound in willows that attracts an oligolectic bee. *Journal Chemical Ecology* 31: 2993-2998.
- Dötterl, S.; Milchreit, K.; Schäffler, I. (2011) Behavioural plasticity and sex differences in host finding of a specialized bee species. *Journal of Comparative Physiology A* 197: 1119-1126.
- Dötterl, S.; Vereecken, N.J. (2010) The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: a review and perspectives. *Canadian Journal of Zoology* 88: 668-697.
- Dressler, R.L. (1982) Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 373-394.

- Greiner, B.; Ribi, W.A.; Warrant, E.J. (2004a). Retinal and optical adaptations for nocturnal vision in the halictid bee *Megalopta genalis*. *Cell Tissue Research* 316: 377-390.
- Greiner, B.; Ribi, W.A.; Wcislo, W.T.; Warrant, E.J. (2004b). Neural organization in the first optic ganglion of the nocturnal bee *Megalopta genalis*. *Cell Tissue Research* 318: 429-437.
- Hammer, O.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analyses. *Paleontologia eletrônica* 4.
- Jander, U.; Jander, R. (2002) Allometry and resolution of bee eyes (Apoidea). *Arthropod Structure & Development* 30: 179-193.
- Kerfoot, W.B. (1967) Correlation between ocellar size and the foraging activities of bees (Hymenoptera; Apoidea). *The American Naturalist* 101: 65-70.
- Knoll, F.R.; 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. *Revista Brasileira de Entomologia* 56: 481-488.
- Knudsen, J.T.; Eriksson, R.; Gershenzon, J.; Stahl, B. (2006) Diversity and distribution of floral scent. *Botanical Review* 72: 1-120.
- Knudsen, J.T.; Tollsten, L. (1995) Floral scent in bat-pollinated plants: a case of convergent evolution. *Botanical Journal of the Linnean Society* 119: 45-57.
- Köppen, W. (1948) *Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra*. Fondo de Cultura Económica. México. 479p.
- Loughrin, J.H.; Hamilton-Kemp, T.R.; Andersen, R.A.; Hildebrand, D.F. (1990) Volatiles from flowers of *Nicotiana sylvestris*, *N. otophora* and *Malus domestica*: headspace components and Day/Night changes in their relative concentrations. *Phytochemistry* 29: 2473-2477.
- Lunau, K. (1991) Innate flower recognition in bumblebees (*Bombus terrestris*, *B. lucorum*; Apidae): optical signals from stamens as landing reaction releasers. *Ethology* 88: 203-214.

- Maia, A.C.D.; Dötterl, S.; Kaiser, R.; Silberbauer-Gottsberger, I.; Teichert, H.; Gibernau, M.; Navarro, D.M.A.F.; Schlindwein, C.; Gottsberger, G. (2012) The key role of 4-methyl-5-vinylthiazole in the attraction of scarab beetle pollinators: a unique olfactory floral signal shared by Annonaceae and Araceae. *Journal of Chemical Ecology* 38: 1072-1080.
- Milet-Pinheiro, P.; Ayasse, M.; Dobson, H.E. M.; Schlindwein, C.; Francke, W.; Dötterl, S. (2013) The Chemical Basis of Host-Plant Recognition in a Specialized Bee Pollinator. *Journal of Chemical Ecology* 39: 1347-1360.
- Milet-Pinheiro, P.; Ayasse, M.; Schlindwein, C.; Dobson, H.E.M.; Dötterl, S. (2012) Host location by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee: innate and learned behavior. *Behavioral Ecology* 23: 531-538.
- Pereira, J.; Schlindwein, C.; Antonini, Y.; Maia, A.C.D.; Dötterl, S.; Martins, C.; Navarro, D.M.A.F.; Oliveira, R (2014) *Philodendron adamantinum* (Araceae) lures its single cyclocephaline scarab pollinator with specific dominant floral scent volatiles. *Biological Journal of the Linnean Society* 111: 679-691
- Raguso, R.A. (2004) Flowers as sensory billboards: progress towards an integrated understanding of floral advertisement. *Current Opinion of Plant Biology* 7: 434-440.
- Waelti, M.O.; Muhlemann, J.K.; Widmer, A.; Schiestl, F.P. (2007) Floral odour and reproductive isolation in two species of *Silene*. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 111-121.
- Warrant, E.J.; Kelber, A.; Gisle'N, A.; Greiner, B.; Ribi, W.; Wcislo, W.T. (2004) Nocturnal vision and landmark orientation in a tropical halictid bee. *Current Biology* 14: 1309-1318.
- Wcislo, W.T.; Arneson, L.; Roesch, K.; Gonzalez, V.; Smith, A.; Fernández, H. (2004) The evolution of nocturnal behavior in sweat bees, *Megalopta genalis* and *M. ecuadoria* (Hymenoptera: Halictidae): an escape from competitors and enemies? *Biological Journal Linnean Society* 83: 377-387.
- Wcislo, W.T.; Tierney, S.M. (2009) Behavioural environments and niche construction: the evolution of dim-light foraging in bees. *Biological Reviews* 84: 19-37.
- Whitney, H.M.; Kolle, M.; Andrew, P.; Chittka, L.; Steiner, U.; Glover, B.J. (2009) Floral iridescence, produced by diffractive optics, acts as a cue for animal pollinators. *Science* 323: 130-133.

Williams, N.H. (1982) The biology of orchids and euglossine bees. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, J. Arditti (Ed.). Cornell University Press, Ithaca, New York.