

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Letícia Cândida Pataca

**IMPACTO DE MACHOS DE ABELHAS OLIGOLÉTICAS NA POLINIZAÇÃO DE
CALIBRACHOA ELEGANS (SOLANACEAE)**

Belo Horizonte
2020

Letícia Cândida Pataca

**IMPACTO DE MACHOS DE ABELHAS OLIGOLÉTICAS NA POLINIZAÇÃO DE
CALIBRACHOA ELEGANS (SOLANACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Clemens Schlindwein

Coorientadora: Dra. Reislá Oliveira

043 Pataca, Leticia Cândida.
Impacto de machos de abelhas oligoléticas na polinização de *Calibrachoa elegans* (Solanaceae) [manuscrito] / Leticia Cândida Pataca. – 2020.

36 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Clemens Schlindwein. Coorientadora: Dra. Reislá Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

1. Abelhas. 2. Polinização. 3. Comportamento. 4. Solanaceae. I. Schlindwein, Clemens. II. Oliveira, Reislá. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 581



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - MESTRADO
(Defesa MS nº 183)

LETÍCIA CÂNDIDA PATACA

Data: 15/12/2020

Entrada: 2018/2

Mat.: 2018711894

CPF: 09144045638

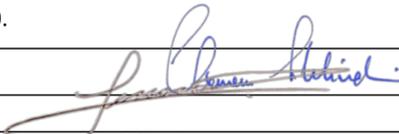
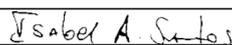
Às 14 horas do dia 15 de dezembro de 2020, reuniu-se a Comissão Examinadora de Dissertação indicada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “**Impacto de machos de abelhas oligoléticas na polinização de *Calibrachoa elegans* (Solanaceae)**”, requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal e Ecologia, pela discente **Letícia Cândida Pataca** Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, professor Dr. Clemens Schlindwein, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Membro da Comissão Examinadora	Instituição	Resultado
Dr. Clemens Schlindwein (orientador)	Universidade Federal de Minas Gerais	Aprovada
Dr. Fernando Cesar Vieira Zanella	Universidade Federal da Integração Latino-Americana – UNILA	Aprovada
Dra. Isabel Alves dos Santos	Universidade de São Paulo	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou-se presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2020.

Dr. Clemens Schlindwein (orientador)	
Dr. Fernando Cesar Vieira Zanella	
Dra. Isabel Alves dos Santos	

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Clemens e à Reisla, meus orientadores, pela confiança e excelente orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

À UFMG, ao ICB e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Ao laboratório Ecologia de Abelhas e da Polinização (Plebeia), por ceder espaço e material para minha pesquisa. A todos os integrantes do laboratório Plebeia por fornecer apoio profissional e emocional.

Agradeço à Vale pela autorização de pesquisa na Serra da Calçada; ao ICMBio e ao IEF pela concessão das licenças de pesquisa; à Capes pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Aos ajudantes de campo: Gabrielle, Izabella, Caê, Isabelle Cerceau e Adriano. Agradeço principalmente à Ana Luísa, parceira de trabalho e grande amiga. Obrigada pela paciência com minhas crises existenciais no campo.

Agradeço ao Rafael e ao Celso, pela hospedagem para a condução dos trabalhos de campo. Ao Jacaré, pelas boas conversas enquanto esperamos a chuva passar e pelas paçoquinhas gratuitas; ao Guilherme e à organização ARCA AMASERRA, pelo apoio.

Ao Caê, pela enorme paciência e prova de amor ao ir a campo comigo. Obrigada pelo apoio nos momentos difíceis, que me ajudou a seguir em frente.

Por fim, aos meus amigos e familiares por me ajudarem nesta trajetória.

“Reconhecer a eminência dos insetos leva à sabedoria.” (Manoel de Barros, Tratado geral das grandezas do ínfimo, 2001)

RESUMO

Estudamos a associação entre *Calibrachoa elegans* (Miers) (Solanaceae) e *Hexanthera missionica* (Oglobin 1948) (Colletidae, Neopasiphaeinae) no Campo Rupestre de Minas Gerais, um exemplo de interação altamente especializada entre planta e abelha oligolética. O desempenho dos machos de abelhas oligoléticas como polinizadores é pobremente conhecido. Este trabalho tem por objetivo a investigação do papel desempenhado pelos machos da abelha *H. missionica* como polinizadores da planta *C. elegans*. Perguntamos: Quais são os tipos de visitas florais dos machos e em quais eles tocam o estigma e podem transferir pólen? Qual o impacto do comportamento de corte de estames e estiletos nas flores para dormitório, na frutificação e formação de sementes de *C. elegans*? Enquanto realizam voos de vistoria em busca de fêmeas, podem, em 16% dos casos, entrar nas flores de *C. elegans* para tomar néctar. Com isso, saem das flores contendo grãos de pólen aderidos ao seu corpo. Ao entrar em outra flor para tomar néctar, podem contactar o estigma da flor e, assim, transferir grãos de pólen e promover a polinização. Portanto, embora machos de *H. missionica* não sejam tão eficientes polinizadores quanto as fêmeas, cuja taxa de polinização em visita única é de 40% e 93%, respectivamente, eles também polinizam *C. elegans*. Para se abrigar dentro da flor, a abelha corta os estames e o estilete com suas mandíbulas. Esse comportamento induz a precoce senescência das flores. Machos que cortam as flores de primeiro dia podem causar um impacto negativo, uma vez que o tubo polínico ainda não atingiu o ovário em menos de 24 horas. Entretanto, apenas 33% dos machos preferem flores do primeiro dia, mostrando um baixo impacto negativo em flores de *C. elegans*.

Palavras-chave: Oligoletia. Polinização por machos. Comportamento. Dormitórios de machos.

ABSTRACT

We studied the association between *Calibrachoa elegans* (Miers) (Solanaceae) and *Hexanthera missionica* (Oglobin 1948) (Colletidae, Neopasiphaeinae) in Campo Rupestre of Minas Gerais, a highly specialized interaction between a plant and an oligolectic bee. The performance of male oligolectic bees as pollinators is poorly understood. Therefore, this work aims to investigate the role played by males of the bee *H. missionica* as pollinators of its host plant. We ask: What are the types of floral visits by males and in which they touch the stigma and can transfer pollen? What is the impact of stamen and style cutting behavior on dormitory flowers on the fruit and seed set of *C. elegans*? Our results show that male bees can enter the flowers of *C. elegans* to drink nectar in 16% of cases, during inspection flights in search for females. After visits, they leave the flowers containing pollen grains adhered to their body. When entering another flower to drink nectar, they can contact its stigma and, thus, transfer pollen grains and promote pollination. Therefore, although males of *H. missionica* are not as efficient pollinators as females, whose pollination rate in a single visit is 40% and 93%, respectively, they also pollinate *C. elegans*. To take shelter inside the flower, the bee cuts the stamens and the style with their jaws. This behavior induces the senescence of flowers. Males that cut flowers on the first day of anthesis can impact them negatively, since the pollen tube has not yet reached the ovary in less than 24 hours. However, only 33% of the males preferred flowers from the first day of anthesis, which indicates a low negative impact on flowers of *C. elegans*.

Keywords: Oligolecty. Pollination by males. Behaviour. Male sleeping places.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2. INTRODUÇÃO.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Local de estudo	14
3.2. Espécies estudadas.....	14
3.3. Machos de <i>H. missionica</i> são polinizadores de flores de <i>C. elegans</i> ?	15
3.3.1. Comportamento e frequência de machos de <i>H. missionica</i>	15
3.3.2. Formação de fruto após visita única por machos de <i>H. missionica</i>	16
3.3.3. Pólen aderido à superfície do corpo dos machos de <i>H. missionica</i>	16
3.4. Impacto do estabelecimento de dormitórios florais na viabilidade floral de <i>C. elegans</i>	16
3.4.1. Dormitórios florais de <i>H. missionica</i> em flores de <i>C. elegans</i>	16
3.4.2. Experimento 1: Frutificação de flores com corte manual de estames e estilete em diferentes horários.....	17
3.4.3. Experimento 2: Longevidade de flores submetidas ao corte manual de estames e estilete em diferentes dias	17
3.5. Análises estatísticas	17
4. RESULTADOS.....	19
4.1. Comportamento e frequência de machos nas flores.....	19
4.2. Formação de fruto após visita única por machos de <i>H. missionica</i>	21
4.3. Pólen aderido à superfície do corpo dos machos de <i>H. missionica</i>	21
4.4. Impacto do estabelecimento de dormitórios florais em <i>C. elegans</i>	22
4.5. Idade de flores usadas como dormitório	24
4.6. Impacto do corte do estilete das flores utilizadas como dormitório floral na frutificação e formação de sementes.....	24
4.6.1. Experimento 1: Frutificação de flores com corte manual de estames e estilete em diferentes horários.....	25

4.6.2. Experimento 2: Longevidade de flores com corte manual de estames e estilete	27
5. DISCUSSÃO	28
5.1. Machos de <i>H. missionica</i> são polinizadores de <i>C. elegans</i> ?.....	28
5.2. O impacto da estratégia reprodutiva dos machos à polinização	29
5.3. Qual o impacto do emprego de flores de <i>C. elegans</i> como dormitórios na formação de frutos e sementes?	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO GERAL

As relações entre polinizadores e Angiospermas abrangem um contínuo desde sistemas altamente especializados onde uma espécie de planta é polinizada por uma espécie de polinizador até amplamente generalizados, onde flores são polinizadas por polinizadores de diferentes grupos taxonômicos (Ollerton *et al.*, 2007). Sistemas de polinização especializados tem sido objeto de estudo há mais de um século (Darwin, 1862; Stebbins, 1970; Fægri e van der Pijl, 1979).

A especificidade de sistemas de polinização geralmente é resultado de características de polinizadores e combinações de atributos florais, como aromas específicos, cores e morfologia floral que restringe o acesso dos visitantes florais aos recursos florais e facilita a visita de um grupo de visitantes florais e exclui outros (Faegri e van der Pijl, 1979; Pettersson, 1991; Johnson e Bond, 1994; Manning e Goldblatt, 1997 e Johnson e Steiner, 2000). Assim, uma planta apresenta polinização especializada se for polinizada com sucesso apenas por um grupo funcional de potenciais polinizadores (Fenster *et al.*, 2004).

As abelhas são o grupo mais importante de polinizadores, visitando mais de 90% dos 107 principais tipos de produções agrícolas para alimentação humana (Klein *et al.*, 2007; Potts *et al.*, 2016). Entretanto, um número crescente de espécies de abelhas em todo o mundo caminha para a extinção. Destruição de habitats (desmatamento, expansão de áreas para agricultura, crescimento urbano, estradas) e o uso excessivo de inseticidas afetam negativamente as populações de abelhas (Michener, 2007; Potts *et al.*, 2016).

Machos e fêmeas apresentam diferenças marcantes nos padrões de forrageamento, incluindo preferências florais, frequência no forrageamento, taxas e constância na deposição de pólen, as quais influenciam a reprodução das plantas (Smith, Bronstein e Papaj, 2019). Machos e fêmeas visitam flores por recursos. As abelhas fêmeas fornecem à sua prole alimentos derivados de flores, coletando ativamente néctar e pólen (Michener 2007; Smith, Bronstein e Papaj, 2019). Machos somente coletam néctar para cobrir a demanda própria por energia (Michener, 1974). Além disso, buscam por fêmeas e abrigo nas flores (Oliveira *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2017). Isto tem consequências no padrão de forrageamento e no recurso procurado.

Abelhas oligoléticas são aquelas cujas fêmeas coletam pólen exclusivamente de plantas do mesmo gênero ou família (Robertson, 1925). Todas as espécies de abelhas oligoléticas são solitárias, ocorrendo em pelo menos 12 tribos de abelhas, especialmente Andrenidae –

Panurginae, Apidae não corbiculadas e Colletidae - Neopasiphaeinae (Schlindwein, 2004). Há uma hipótese de que todas as abelhas Neopasiphaeinae são oligoléticas (Schlindwein, 2004). Por exemplo, *Bicolletes indigoticus* e *Actenosigynes mantiqueirensis* (Neopasiphaeinae) são oligoléticas em *Blumenbachia* (Loasaceae) (Siriani-Oliveira *et al.*, 2018; Siriani-Oliveira, *et al.*, 2020), *Protodiscelis palpalis* em *Hydrocleys martii* (Limnocharitaceae) (Oliveira *et al.*, 2012; Carvalho e Schlindwein, 2011) e *Cephalocolletes rugata* em *Opuntia* (Cactaceae) (Schlindwein e Wittmann, 1997). As espécies de plantas que são relacionadas às abelhas oligoléticas são quase exclusivamente ervas ou pequenos arbustos (Schlindwein, 2004). No Brasil, foram demonstradas em 19 famílias de plantas (Schlindwein, 2004).

Machos de abelhas oligoléticas frequentemente buscam fêmeas nas flores, é uma estratégia reprodutiva associada aos recursos florais, por exemplo, machos de *Arhysosage cactorum* patrulham flores de *Parodia neohorstii* (Cerceau *et al.*, 2019) e *Anthrenoides micans* patrulham flores de *Parodia neobuenekeri* (Dutra *et al.*, 2020).

Petunia e *Calibrachoa* são gêneros da tribo Petunieae (Solanaceae) (Fregonezi *et al.*, 2013). Quase todas as espécies do gênero *Calibrachoa* são melitófilas (Fregonezi 2009). *Callonychium petuniae* (Andrenidae) é uma importante espécie na polinização de *Calibrachoa* e *Petunia*, cujos machos têm a estratégia reprodutiva vinculada às flores (Wittmann *et al.*, 1990). Três espécies de *Pseudagapostemon* (Halictidae) também são potenciais polinizadores de *Calibrachoa* e *Petunia* (Fregonezi 2009). *Calibrachoa elegans*, endêmica de Minas Gerais, é polinizada pela espécie *Hexanthera missionica* (Colletidae, Neopasiphaeinae) (Stehmann e Semir, 2001; Vieira, 2019).

Este trabalho apresenta a interação entre machos de abelha *Hexanthera missionica* e *Calibrachoa elegans*. As fêmeas de *H. missionica* são oligoléticas em *Calibrachoa* e *Petunia*, que apresentam um sistema de polinização altamente especializado (Stehmann e Semir, 2001; Schlindwein, 2004). Os machos de *H. missionica* patrulham as flores de *C. elegans* em busca de fêmeas, tomam néctar e dormem nas flores, cortando estames e o estilete (Stehmann e Semir, 2001). Os objetivos deste trabalho são entender o papel dos machos como polinizadores de *C. elegans* além de saber se os danos florais aplicados na preparação do dormitório têm impacto negativo ao sucesso reprodutivo da planta.

Apresentamos um vídeo de divulgação científica sobre abelhas que dormem nas flores, com alguns resultados do nosso trabalho. O vídeo pode ser acessado através do link: <https://youtu.be/2gItanoNq7Y>

2. INTRODUÇÃO

Abelhas, os polinizadores mais importantes das Angiospermas, dependem de recursos florais como fonte de alimento. Portanto, estão constantemente em contato com as flores o que aumenta a chance de transferir grãos de pólen entre flores (Roubik, 1995; Michener 2007).

Devido às diferenças inerentes ao sexo, fêmeas e machos de abelhas recorrem às flores por motivações diferentes. Além de cobrir a demanda própria de energia, as fêmeas visitam flores em busca de pólen, néctar e óleos florais para prover recursos para a prole (Michener, 2007). Desta forma, passam grande parte do seu tempo em contato com as flores. Machos, por sua vez, visitam flores em busca de néctar somente por demanda própria de energia (Michener, 2007). Para machos de várias espécies de abelhas, no entanto, flores também são locais para buscar por parceiras sexuais (Alcock *et al.*, 1978, Cane *et al.*, 2011, Oliveira, 2015). Isto é especialmente comum em abelhas oligoléticas, as quais coletam pólen exclusivamente em espécies de plantas do mesmo gênero ou família para alimentar sua cria (Robertson, 1925). Nestas especialistas florais, a alta previsibilidade de encontrar parceiras nas flores, favorece certas estratégias reprodutivas, como patrulha e defesa de territórios de flores de plantas hospedeiras (Alcock *et al.*, 1978; Parker, 1978; Thornhill & Alcock, 1983; Wittmann *et al.*, 1990; Oliveira e Schindwein, 2010; Alcock e Buchmann, 2011; Oliveira *et al.*, 2013; Oliveira, 2015; Dutra *et al.*, 2020). Machos de abelhas também frequentemente buscam abrigo noturno em flores (Simpson e Neff, 1981; Dafni *et al.*, 1981; Gaglianone, 2000; Sapir, Shmida e Ne'eman, 2005, Pinheiro *et al.*, 2017).

Apesar das variações em atributos morfológicos e comportamentais de polinizadores atribuídas ao sexo afetarem sua interação com flores, o efeito das diferenças intraespecíficas dos polinizadores permanece largamente inexplorado (Smith *et al.*, 2019). O desempenho dos machos de abelhas como polinizadores também é pobremente conhecido, exceto por casos excepcionais como das interações entre os machos de Euglossini (Apidae), coletores de perfumes florais, que polinizam cerca de 10% das espécies da flora neotropical de Orchidaceae (Dressler, 1982; Roubik e Hanson, 2004; Eltz *et al.*, 2005) e de sistemas de polinização por pseudo-cópulas, em que machos tentam copular com flores que mimetizam fêmeas (Kullenberg, 1950; Paulus, 2006; Ayasse *et al.*, 2010; Vereecken *et al.*, 2011).

É razoável esperar que machos de abelhas oligoléticas, pelo uso de flores como sítios de *rendez-vous*, também atuem como polinizadores de flores das plantas hospedeiras de fêmeas coespecíficas. De fato, em *Peponapis pruinosa* (Apidae, Eucerini), espécie oligolética em

Cucurbita (abóbora, Cucurbitaceae), machos, como as fêmeas, são polinizadores efetivos de *Cucurbita pepo* e contribuem com a formação de frutos maiores e com mais sementes (Cane *et al.*, 2011). Machos de *Arhysosage cactorum* (Andrenidae) também são importantes na polinização de cactos globosos em que a espécie é oligolética (Cerceau *et al.*, 2019) e machos de *Melissodes* sp. (Apidae) também polinizam flores de girassol (Parker, 1981).

Estudamos a associação entre *Calibrachoa elegans* (Miers) (Solanaceae) e *Hexanthera missionica* (Oglobin 1948) (Colletidae, Neopasiphaeinae) no Campo Rupestre de Minas Gerais, um exemplo de interação altamente especializada entre planta e abelha oligolética (Stehmann e Semir, 2001; Vieira *et al.*, em prep.). Abelhas de *H. missionica* são os únicos polinizadores dessa espécie e machos patrulham as flores em busca de fêmeas para acasalamento. Além disso, os machos utilizam a flor como abrigo noturno cortando estames e estilete para preparar o dormitório floral, um comportamento que foi considerado negativo na reprodução da planta (Stehmann e Semir, 2001; Danforth *et al.*, 2019). Como as flores são um sítio previsível de encontro de parceiras sexuais e fonte de recurso alimentar, os machos devem incluir as flores no seu repertório comportamental e, portanto, podem atuar como polinizadores.

Neste estudo, buscamos esclarecer o papel dos machos de *H. missionica* como polinizadores de *C. elegans*. Para tal, avaliamos sua frequência de visitas florais com contato no estigma ao longo do dia, caracterizamos a carga de pólen aderido ao corpo dos machos e sua efetividade de polinização após uma visita floral. Avaliamos experimentalmente o impacto do emprego de flores de *C. elegans* como dormitórios na formação de frutos. Temos a hipótese de que o corte do estilete dos machos aplicado na preparação do dormitório não impacta a formação de frutos em flores polinizadas após passagem do tubo polínico (24 horas polinização – Stehmann e Semir, 2001). Para isso, também avaliamos experimentalmente a taxa de frutificação de flores com estiletos cortados em diferentes idades.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de estudo

O estudo foi conduzido de setembro de 2018 a fevereiro de 2019 e de novembro de 2019 a março de 2020, realizado na unidade de conservação Monumento Natural Serra da Calçada, Serra da Moeda, na Cadeia de Espinhaço, no município de Nova Lima, MG, Brasil (20°05'35"S e 43°58'59"W, 1.470m de altitude). O local é parte do Quadrilátero Ferrífero, com vegetação característica de Campo Rupestre sobre canga (Viana e Lombardi, 2007). O clima da região é tropical de altitude (Cwb), com verão chuvoso (outubro a março) e uma estação seca (abril a setembro) bem definida (Stehmann e Semir, 2001). A temperatura varia entre 18°– 21°C e o regime pluviométrico apresenta variação de 1.300–2.100 mm de precipitação anual (Guarçoni *et al.*, 2010).

3.2. Espécies estudadas

Calibrachoa elegans é endêmica de Minas Gerais, restrita às áreas de canga hematítica nodular do campo rupestre (Stehmann, 1999). A espécie é ameaçada de extinção (CNCFlora, 2012).

Representantes de *C. elegans* são subarbustos de até 50 cm de altura e florescem de setembro a maio (Stehmann, 1999). As flores são zigomorfas e possuem cinco estames heterodínamos com anteras e pólen amarelas, filetes adnatos à corola, delineando cinco ductos interestaminais que dão acesso à câmara nectarífera e disco nectarífero na base do tubo floral (Stehmann e Semir, 2001). A corola é do tipo goela, apresenta coloração magenta e um anel azul-violáceo em formato semilunar na margem do tubo floral (Stehmann e Semir, 2001). É uma espécie autoincompatível. Após polinização cruzada, o tubo polínico atinge ovário e óvulos depois de 24 horas (Stehmann e Semir, 2001).

Hexanthes missionica é uma espécie de abelha solitária, pertencente à subfamília Neopasiphaeinae (Colletidae) (*sensu* Almeida *et al.*, 2012) que ocorre da Argentina até Minas Gérias, no Sudeste do Brasil, o limite norte da sua distribuição geográfica (Urban e Graf, 2000; Moure, Graf e Urban, 2012). A espécie é oligolética em espécies de *Calibrachoa* e *Petunia* (Solanaceae), fontes de néctar e pólen (Schlindwein, 2004; Fregonezi, 2009; Alves-dos-Santos *et al.*, 2016).

3.3. Machos de *H. missionica* são polinizadores de flores de *C. elegans*?

3.3.1. Comportamento e frequência de machos de *H. missionica*

As atividades dos machos foram monitoradas de 08:00 h às 16:00 h, por 7 dias não consecutivos. A cada hora, por 30 minutos, foram percorridos trajetos definidos aleatoriamente, em uma área de 5.810 metros quadrados, totalizando 73 intervalos de observação. Determinamos como início da atividade dos machos o horário que estes deixam seus dormitórios florais e como fim da atividade, o momento em que estabeleçam um dormitório floral. Para cada indivíduo avistado, anotamos o horário e classificamos seu comportamento de acordo com um etograma (Tabela 1) previamente elaborado.

Para determinar um cronograma de atividades dos machos em flores, durante caminhadas aleatórias entre 9:30h e 13:30h, foi registrada a duração de todos os comportamentos dos machos avistados em flores de *C. elegans*. Também verificamos se machos tomam néctar em flores de outras espécies de plantas nos arredores.

Tabela 1: Etograma dos comportamentos dos machos de *Hexanthera missionica* em flores de *Calibrachoa elegans*

Vistoriar flores	O macho diminui a velocidade de voo ao sobrevoar a flor de <i>C. elegans</i> .
Pairar	O macho adeja em frente à flor.
Pousar no limbo floral	O macho pousa sobre o limbo da flor; raramente insere a cabeça no tubo floral sem alcançar estames e estigma.
Entrar no tubo floral	O macho entra com todo corpo no tubo floral, com coleta de néctar.
Limpar-se	O macho pousa no limbo e esfrega as pernas sobre o corpo.
Preparação do dormitório	O macho corta estames e estilete da flor.
Dormir	O macho dorme no tubo floral com a cabeça virada para a abertura do tubo floral.

3.3.2. Formação de fruto após visita única por machos de *H. missionica*

Avaliamos a efetividade de polinização por um macho após uma única visita à uma flor de *C. elegans*. Para isso, ensacamos 15 flores em pré-antese de diferentes indivíduos (uma flor por indivíduo), para impedir visitas de abelhas. Às 12:00 h, desensacamos a flor e aguardamos a visita de um macho, com inserção total do corpo na flor, e ensacamos novamente a flor após a visita. Determinamos a taxa de frutificação e contamos o número de sementes formadas a partir dessas flores.

3.3.3. Pólen aderido à superfície do corpo dos machos de *H. missionica*

Machos coletados aleatoriamente em flores, entre 8:00h e 16:00h, foram depositados por um minuto em uma caixa de isopor com gelo. Com uma lupa de mão, inspecionamos a superfície do corpo de cada macho, em busca de pólen. Cada macho foi marcado com código individual de cor com tinta (*Revell*, Germany) no meso e/ou metassoma. Em 27 machos, verificamos o local de adesão do pólen no seu corpo. Em sete machos, removemos grãos de pólen, friccionando uma porção de gelatina glicerinada corada com fucsina sobre o corpo do macho e transferindo-a para lâminas de microscópio para análise do pólen. Anotamos o horário de coleta em todas as amostras.

3.4. Impacto do estabelecimento de dormitórios florais na viabilidade floral de *C. elegans*

3.4.1. Dormitórios florais de *H. missionica* em flores de *C. elegans*.

Durante quatro meses coletamos machos avistados em flores na área de estudo. Cada macho foi colocado em uma caixa de isopor com gelo e marcado com código individual de cor (veja acima). Ao total, foram marcados 78 machos. Descrevemos as etapas da preparação dos dormitórios florais e registramos o horário em que os machos deixaram as flores do dormitório pela manhã.

Para esclarecer se machos preferem flores de determinada idade ao estabelecerem dormitórios florais, por quatro dias consecutivos, marcamos e averiguamos a idade de todas as flores em uma área de 100 m². Flores da mesma idade foram marcadas com tinta da mesma cor (cola colorida 3D Acrilex®). Em cada dia registramos a idade das flores empregadas como dormitório.

Comparamos a taxa de frutificação e o número de sementes produzidas a partir de flores utilizadas como dormitórios (N=147) e flores íntegras de mesma idade (N=28).

3.4.2. Experimento 1: Frutificação de flores com corte manual de estames e estilete em diferentes horários

Para testar a hipótese de que o corte do estilete dos machos aplicado na preparação do dormitório não impacta a formação de frutos em flores polinizadas após passagem do tubo polínico (i.e. 24 horas após a polinização – Stehmann e Semir, 2001), comparamos a taxa de frutificação de flores que tiveram seus estiletos cortados em diferentes períodos após a polinização. Para isso, ensacamos 120 flores em pré-antese, impedindo a visita de abelhas. Entre 10:00h e 10:30h, polinizamos manualmente as 120 flores com pólen xenogâmico. Três horas após a polinização manual, retiramos os estames e estilete de 20 flores com uma pinça, e deixamos 20 flores ensacadas intactas (controle). Repetimos o procedimento de corte cinco e 24 horas após a polinização cruzada manual, a cada ocasião deixando 20 flores intactas, como controle. Quantificamos os frutos e as sementes produzidos a partir de flores submetidas a todos os tratamentos. Os frutos maduros foram coletados e suas sementes contadas.

3.4.3. Experimento 2: Longevidade de flores submetidas ao corte manual de estames e estilete em diferentes dias

Para saber se o estabelecimento de dormitório floral reduz a longevidade das flores, ensacamos 55 botões em pré-antese. Simulando o comportamento dos machos, cortamos os estames e o estilete de 15 delas no primeiro dia de antese, de 15 flores no segundo dia e 15 no terceiro dia de antese. As dez flores restantes permaneceram intactas. Registramos a longevidade de todas as flores ao longo de três dias de antese.

3.5. Análises estatísticas

Para testar se machos preferem utilizar como dormitórios flores de dada idade, comparamos o número de flores de primeiro, segundo e terceiro dia de antese utilizadas por machos com uso do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.

Comparamos o número de sementes produzidas por flores íntegras e flores utilizadas como dormitório floral utilizando o teste T de Student. Com emprego do teste ANOVA de um fator, comparamos o número de sementes produzidas a partir de flores cortadas em diferentes horários. A longevidade de flores usadas como dormitórios florais foi comparada utilizando o teste não-paramétrico Mann-Whitney. A taxa de frutificação de flores com estiletos cortados em diferentes horários foi comparada utilizando o teste não-paramétrico Mann-Whitney. Os testes estatísticos foram realizados no software PAST 3.25 (Hammer *et al.* 2001), com nível de

significância $\alpha = 0,05$. Os gráficos foram confeccionados no software Office Excel®. Os valores médios são sempre representados como “Média \pm Desvio Padrão”.

4. RESULTADOS

4.1. Comportamento e frequência de machos nas flores

Os machos começaram as atividades em flores às 8h da manhã. No total de 73 intervalos de observação (36,5 horas), os comportamentos mais registrados foram vistorias de flores (46%; 386 observações), seguido por pousos no limbo da flor (17%; 147 visitas) e visitas florais com entrada no tubo floral (16%; 133 visitas) (Figura 1).

Os machos demoraram $1,04s \pm 0,01s$ (N=216) para vistoriar flores e $52,0s \pm 76,9s$ (N=14) nas visitas pousando no limbo floral. As visitas florais para tomar néctar, com entrada no tubo floral, demoraram $8,16s \pm 4,4s$ (N=11).

Os machos tocaram o estigma somente quando entraram no tubo floral e tomaram néctar (Figura 1; “entrar no tubo floral”). O contato com o estigma ocorre em consequência da posição central do estigma no tubo floral de *C. elegans* (largura do tubo floral = $4,7 \pm 0,3$ mm, N=10). O tamanho médio dos machos (largura do tórax) foi de $3,22 \pm 0,24$ mm (N=15).

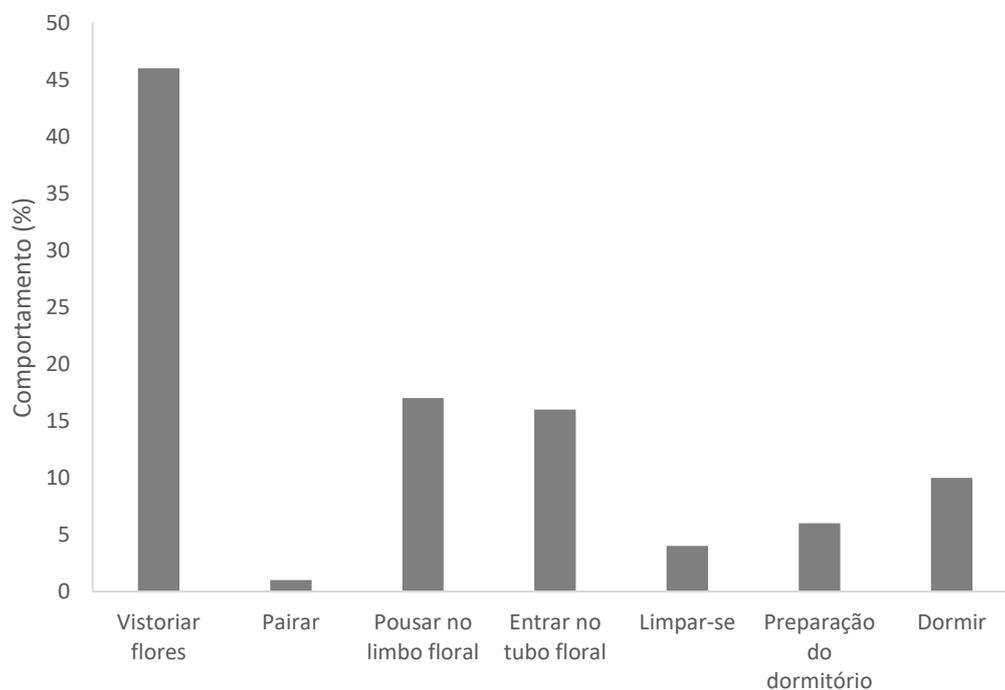


Figura 1: Comportamentos de machos de *Hexanthera missionica* em flores de *Calibrachoa elegans* durante 842 visitas florais e vistorias em flor.

Machos visitaram flores para tomar néctar (visitas com toque no estigma) sobretudo entre 11:00 e 16:30h, com pico de visitas entre 16:00 e 16:30h (Figura 2a). Depois desse horário não houve mais visitas florais. Vistorias florais foram mais frequentes entre 9:00 e 12:30h, com pico entre 10:00 e 10:30h (Figura 2b). Pousos no limbo da flor foram mais frequentes entre 9:00 e 10:30h, com pico entre 10:00 e 10:30h (Figura 2c).

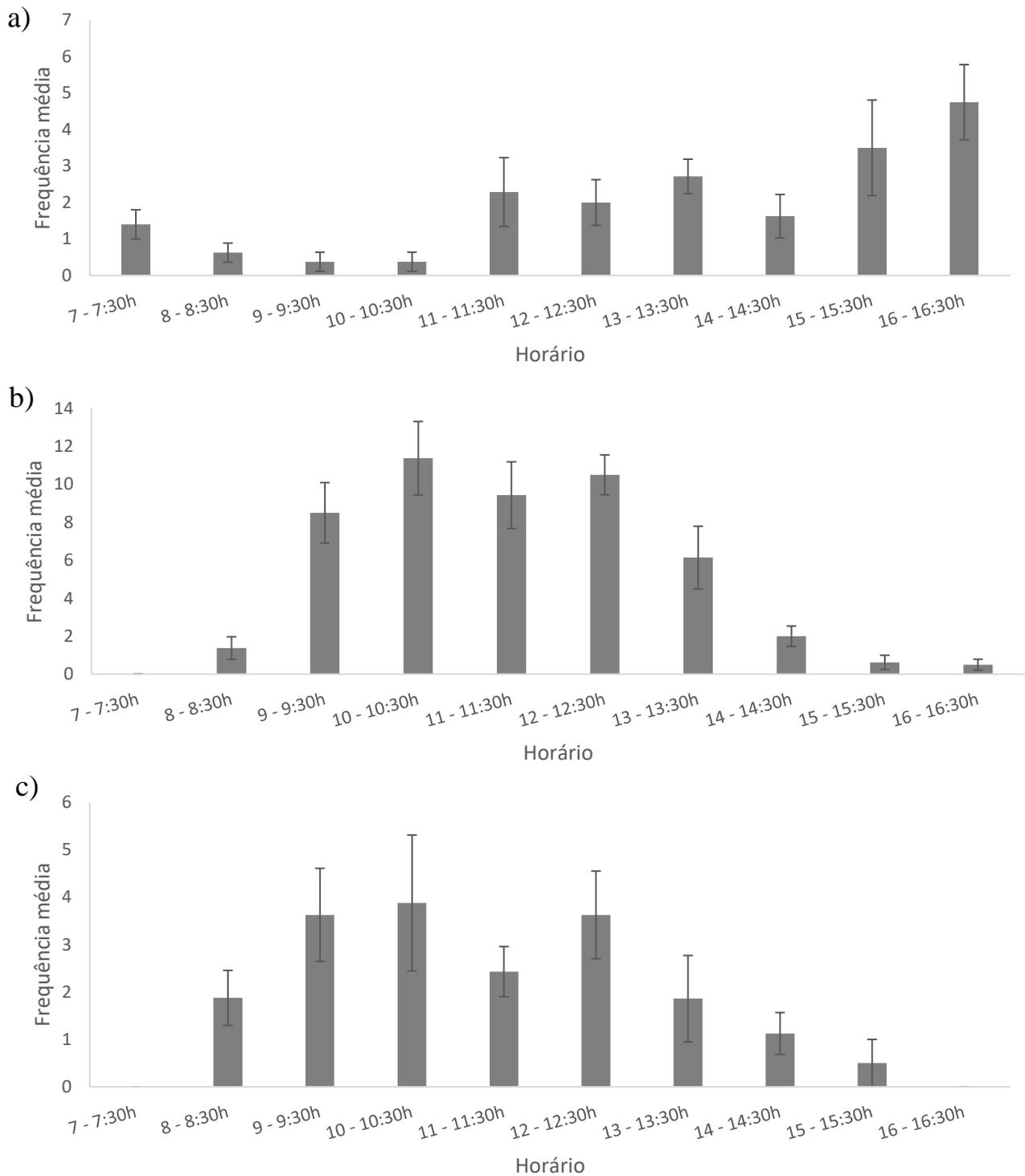


Figura 2: Frequência média de visitas e vistorias de machos de *Hexanthea missionica* em flores de *Calibrachoa elegans* ao longo do dia, **a)** Entradas nos tubos florais (N= 103); **b)** vistorias (N= 384) e **c)** pousos em flores (N=147).

4.2. Formação de fruto após visita única por machos de *H. missionica*

Após visita única de um macho à uma flor de *C. elegans* (“teste de primeira visita”), 40% das flores frutificaram (N=15 visitas). Os frutos tiveram em média $19,0 \pm 5,3$ sementes (N=5).

4.3. Pólen aderido à superfície do corpo dos machos de *H. missionica*

Dos 53 machos analisados, 36 (68%) apresentaram grãos de pólen aderidos à superfície do corpo. Os grãos de pólen removidos da superfície do corpo dos machos foram exclusivamente de *C. elegans*. Não foi observado machos em outras espécies de plantas.

Foram encontrados grãos de pólen aderidos a oito locais na superfície do corpo dos machos, principalmente nas peças bucais, na porção ventral do mesossoma e nas pernas anteriores e médias (Figura 3, 4). Em 37% dos indivíduos, encontramos grãos de pólen aderidos nas peças bucais e na porção ventral do tórax.



Figura 3: Grãos de pólen aderidos ao corpo de um macho de *Hexanthea missionica* após vistas a flores de *Calibrachoa elegans*. Os grãos aderiram preferencialmente às partes bucais, região ventral do mesossoma e pernas anteriores e médias da abelha.

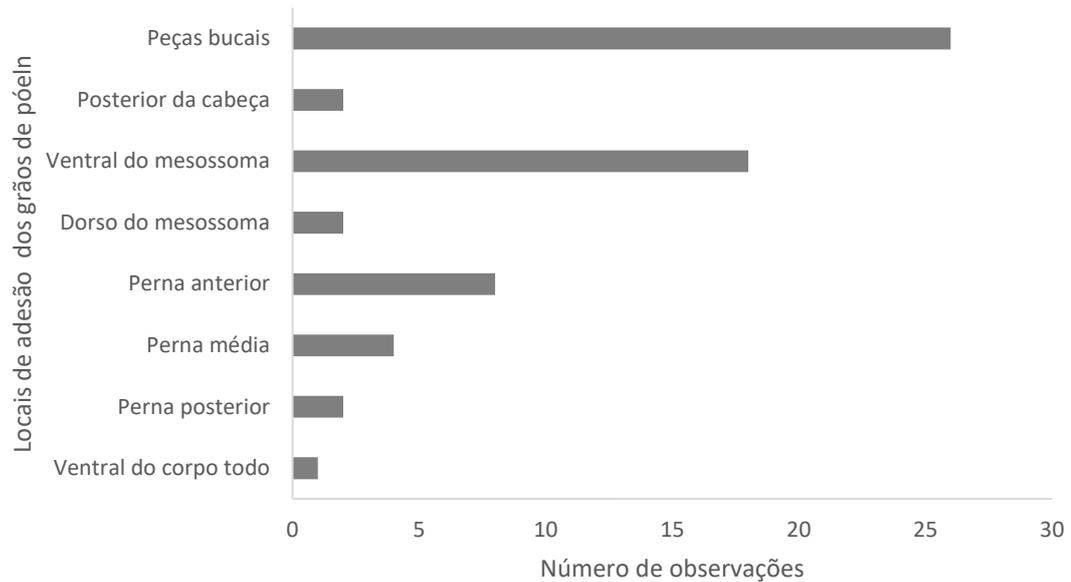


Figura 4: Locais de adesão de pólen na superfície do corpo de machos de *Hexanthea missionica* (N= 63). A contagem dos locais de adesão de pólen pode incluir vários locais no mesmo indivíduo.

4.4. Impacto do estabelecimento de dormitórios florais em *C. elegans*

Os machos cortaram os estames e o estilete das flores de *C. elegans* entre 14:00 e 15:30 horas. No dia seguinte, deixaram as flores a partir das 8:00h. Os cortes foram feitos com as mandíbulas na altura da fusão dos filetes com o tubo da corola. Com as pernas, empurraram os estames e o estilete para fora do tubo floral. Frequentemente, estames e estilete cortados ficaram sobre o limbo da flor após os cortes (Figura 5b). Os cortes dos estames e estiletos foram feitos durante cerca de 10 minutos. Após os cortes, os machos se limpavam e/ou permaneceram imóveis dentro da flor, com a cabeça virada em direção à base floral. Em seguida, os machos se viraram dentro da flor e se acomodaram de ré, posicionando a cabeça em direção à entrada do tubo floral (Figura 5a). Em condições ambientais adversas, como em dias chuvosos, nublados ou frios, os machos permaneceram nos dormitórios florais ao longo do dia. As marcações individuais das flores utilizadas como dormitórios revelaram que os machos não reutilizaram os dormitórios.



Figura 5: a) Macho marcado de *Hexanthera missionica* dormindo em uma flor de *Calibrachoa elegans*. b) Estames e estilete aderidos ao limbo da flor. Os machos permanecem posicionados com a cabeça virada em direção à entrada do tubo floral até o dia seguinte.

4.5. Idade de flores usadas como dormitório

Machos de *H. missionica* empregaram indiscriminadamente flores de diferentes idades como dormitórios florais (Kruskal-Wallis H (χ^2) = 1,019; p = 0,58; N =24) (Figura 6).

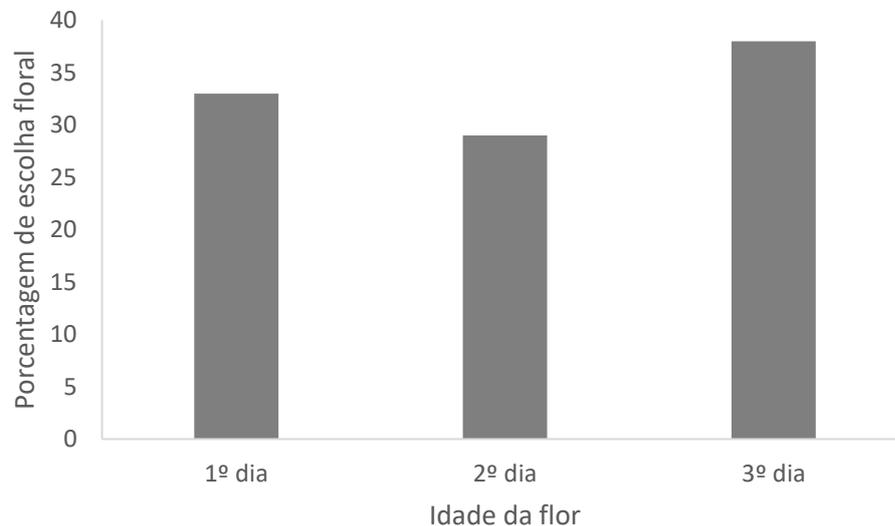


Figura 6: Idade das flores utilizadas para dormitório por machos de *Hexanthera missionica* em uma área de 100 m² (Kruskal-Wallis H (χ^2) = 1,019; p = 0,58).

4.6. Impacto do corte do estilete das flores utilizadas como dormitório floral na frutificação e formação de sementes

Flores empregadas como dormitórios produziram menos frutos ($N=51$ de 147) que as mantidas intactas ($N=16$ de 28) (Mann-Whitney $U=1596$; $z=2,23$; $p= 0,03$) (Tabela 2). Contudo, não houve diferença significativa no número de sementes nos dois grupos (dormitório floral= $11,5 \pm 7,43$ sementes ($N=38$); flores intactas= $11,27 \pm 5,48$ sementes ($N=11$); $t= 0,09$, $p= 0,92$).

Tabela 2: Frutificação e produção de sementes por flores de *Calibrachoa elegans* empregadas ou não como dormitórios florais por machos de *Hexanthera missionica*.

Tratamentos	N flores	Frutificação (%)	Produção de sementes (Média ± DP)
Dormitório floral	147	34,7%	11,5 ± 7,43
Controle	28	57%	11,27 ± 5,48

4.6.1. Experimento 1: Frutificação de flores com corte manual de estames e estilete em diferentes horários

Flores cujos estiletos foram cortados manualmente três ou cinco horas após polinização cruzada manual formaram menos frutos do que flores não manipuladas (controle) (Figura 7a). Flores com os estiletos cortados manualmente 24 horas após a polinização manual frutificaram em 85% (N=20), enquanto as flores do controle frutificaram em 78,9% (N=19) (Figura 7a).

Houve diferenças significativas na frutificação entre flores com os estiletos cortados manualmente entre 3h e o controle (Mann-Whitney $U=43$, $z= 5,18$ $p= 2,17 \times 10^{-7}$) e entre 5h e o controle (Mann-Whitney $U=68$, $z= 3,94$, $p= 8,08 \times 10^{-5}$). Entre 24h e o controle, não houve diferenças significativas (Mann-Whitney $U=178,5$, $z=0,46$, $p= 0,64$). Entre os tratamentos, não houve diferenças estatísticas entre 3h e 5h (Mann-Whitney $U=190$, $z=0,27$, $p=0,39$). Houve diferenças estatísticas entre 3h e 24h (Mann-Whitney $U=60$, $z=3,79$, $p< 0,0001$) e 5h e 24h (Mann-Whitney $U=70$, $z=3,52$, $p=0,0002$). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos na produção de sementes (ANOVA $F=1,86$ $p=0,19$) (Figura 7b).

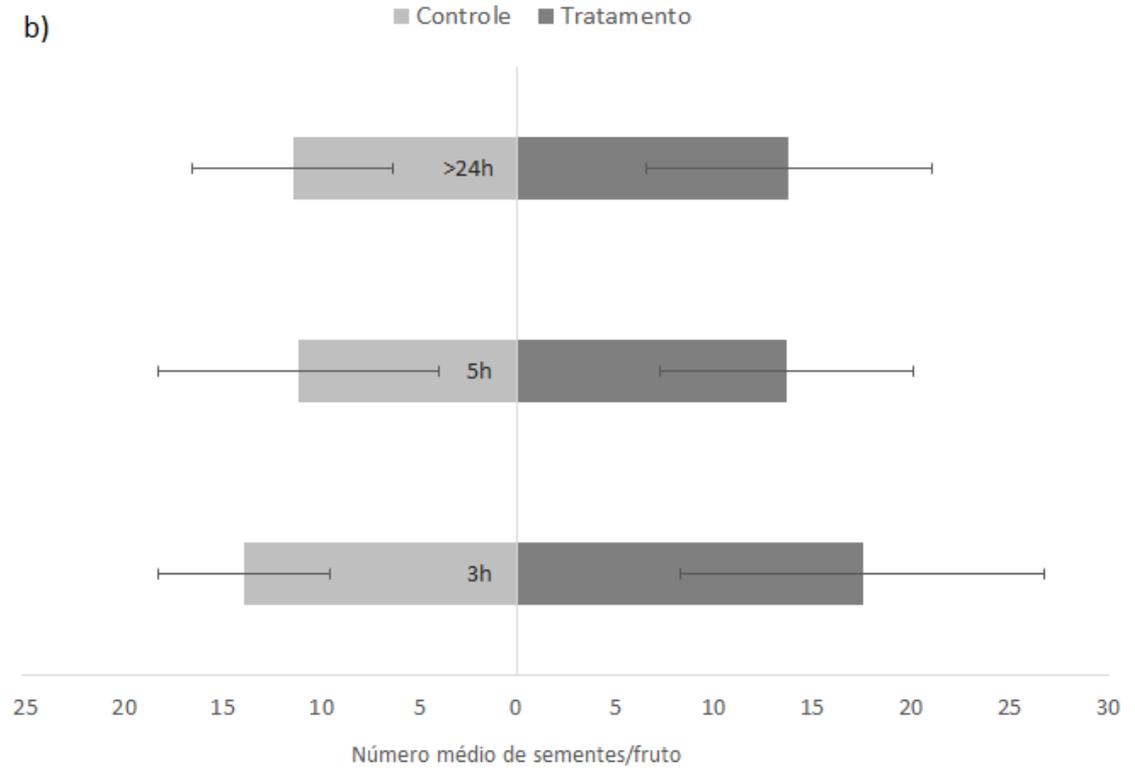
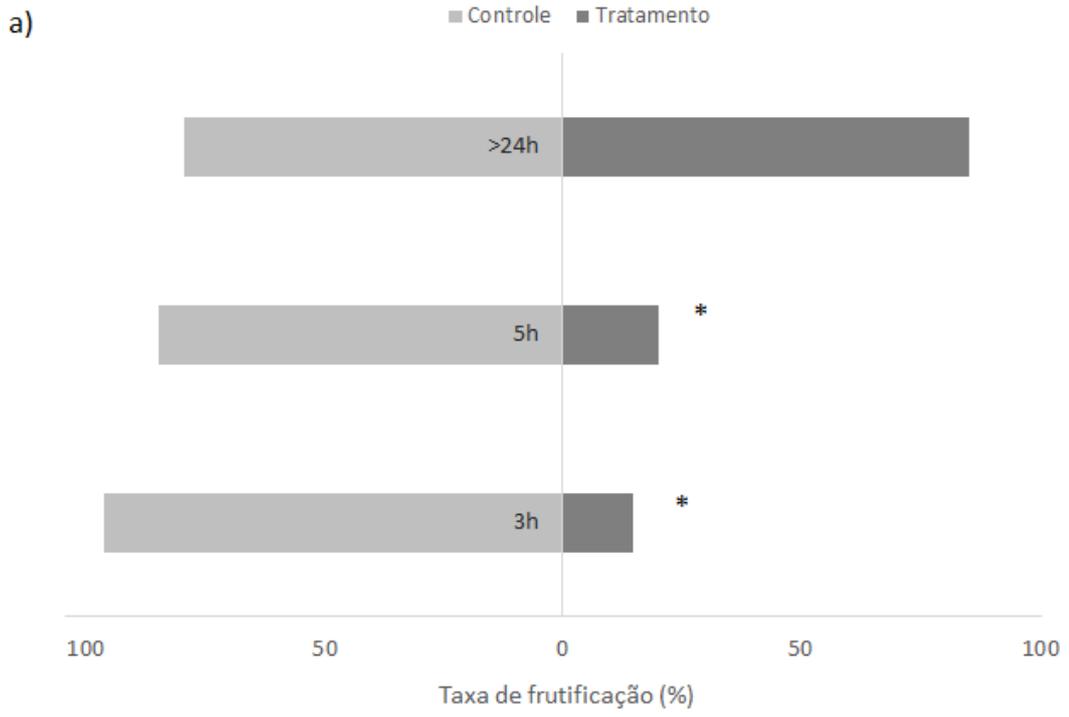


Figura 7: a) Taxa de frutificação de flores cortadas 3 horas ($N_{\text{tratamento}} = 20$ e $N_{\text{controle}} = 22$), 5 horas ($N_{\text{tratamento}} = 20$ e $N_{\text{controle}} = 19$) e 24 horas após a polinização manual ($N_{\text{tratamento}} = 20$ e $N_{\text{controle}} = 19$). * Indica diferenças estatísticas significantes entre os tratamentos e os controles do Teste Mann-Whitney ($P \leq 0,05$). **b)** Produção de sementes por fruto 3h ($N_{\text{tratamento}} = 3$ e $N_{\text{controle}} = 18$), 5h ($N_{\text{tratamento}} = 3$ e $N_{\text{controle}} = 16$) e >24h após a polinização ($N_{\text{tratamento}} = 13$ e $N_{\text{controle}} = 14$). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos na produção de sementes (ANOVA $F=1,86$ $p=0,19$).

4.6.2. Experimento 2: Longevidade de flores com corte manual de estames e estilete

Flores cujos estames e estiletos foram cortados no primeiro e no segundo dia perduraram por três dias, enquanto flores cortadas no terceiro dia de antese tiveram a mesma longevidade das flores não manipuladas, quatro dias (Figura 8).

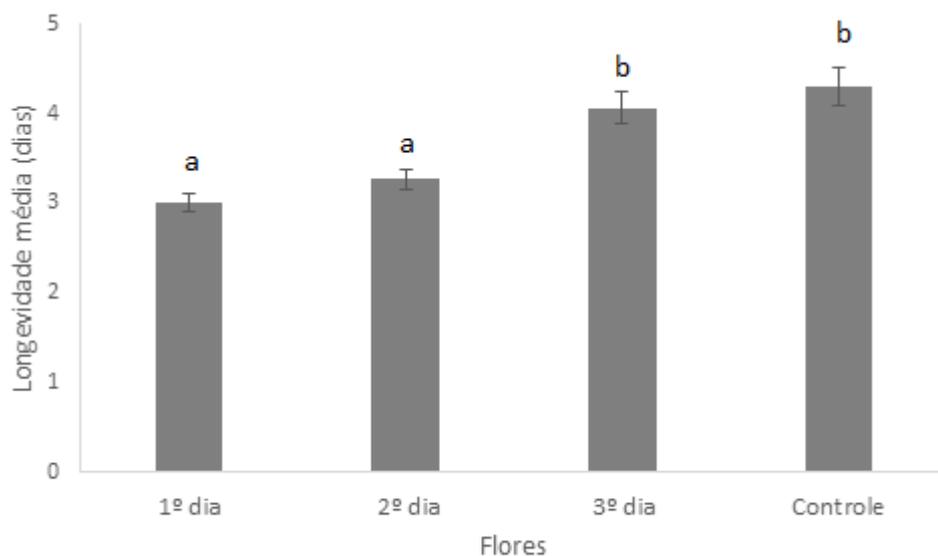


Figura 8: Longevidade de flores de *Calibrachoa elegans* cortadas manualmente (Mann-Whitney $U=10$, $z= 3,98$, $p<0,001$ $N_{\text{corte dia 1}}=15$, $N_{\text{controle}}=10$); ($U=19,5$; $z=3,33$; $p<0,001$ $N_{\text{corte dia 2}}=15$, $N_{\text{controle}}=10$) e ($U=57,5$; $z=1,10$; $p=0,27$ $N_{\text{corte dia 3}}=15$, $N_{\text{controle}}=10$). **a** indica diferenças estatísticas significantes entre os tratamentos e o controle do Teste Mann-Whitney ($P \leq 0,05$). **b** indica diferenças estatísticas não significantes entre o tratamento e o controle do Teste Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Estudamos a associação entre *Calibrachoa elegans* e *Hexanthera missionica*, um exemplo de interação altamente especializada entre planta e abelha oligolética, no Campo Rupestre sobre canga em Minas Gerais. *C. elegans* é uma espécie ameaçada de extinção e, tanto machos quanto fêmeas de *H. missionica*, são cruciais para a reprodução da planta, uma vez que esta é autoincompatível. Nosso estudo mostra que todas as atividades diárias dos machos de *H. missionica* são associados às flores de *C. elegans*. Contudo, apesar dos machos serem visitantes florais constantes e transportarem no corpo pólen de *C. elegans*, apenas em poucas interações com as flores são polinizadores potenciais. Além disso, danos incididos aos estiletos pelos machos durante a preparação dos dormitórios florais apenas impactam negativamente a reprodução da planta hospedeira se aplicados no primeiro dia da antese.

5.1. Machos de *H. missionica* são polinizadores de *C. elegans*?

A principal motivação dos machos de *H. missionica* é a busca por fêmeas. Isso explica seu repertório comportamental de vistoria das flores e seu período de atividade que coincide com o de atividade das fêmeas em flores (Vieira, 2019). Machos de certas espécies oligoléticas podem patrulhar flores onde fêmeas coespecíficas preferencialmente forrageiam (Alves-dos-Santos e Wittmann, 2000; Alcock *et al.*, 2010; Oliveira e Schlindwein, 2010). O pico de atividade dos machos de *Protomeliturga turnerae* (Andrenidae) também coincide com o horário de maior frequência das fêmeas nas flores de *Turnera subulata* (Turneraceae) (Medeiros e Schlindwein, 2003).

Apesar dos machos de *H. missionica* passarem praticamente todo o tempo de vida associados às flores de *C. elegans*, somente em 16% dos comportamentos, quando buscam néctar, são potenciais polinizadores efetivos. Entretanto, os machos são potenciais polinizadores por serem fiéis às flores de *C. elegans*, como demonstrado na análise do pólen depositado na superfície corpórea das abelhas.

Como pólen é um recurso crítico buscado por fêmeas de *H. missionica* em flores de *C. elegans*, fêmeas ajustam o período de sua atividade de forrageio à oferta de pólen e visitam preferencialmente flores novas (Vieira, 2019), como as abelhas polinizadoras de *Petunia mantiquierensis* (Araújo *et al.*, 2020) e *P. secreta* (Rodrigues *et al.*, 2018). Machos, no entanto, ao buscarem por néctar visitam as flores indiscriminadamente. Apesar das flores visitadas apenas por machos terem uma taxa de frutificação menor do que as visitadas apenas por fêmeas (Vieira, 2019), devido à falta de preferência dos machos por flores de certa idade e à maior

abundância nas flores, sugerimos que os machos de *H. missionica* tenham um papel complementar ao das fêmeas na polinização de *C. elegans*.

5.2. O impacto da estratégia reprodutiva dos machos à polinização

Estratégias reprodutivas de machos de abelhas oligoléticas nas flores das plantas hospedeiras das fêmeas são comuns e podem resultar em visitas florais adicionais durante a busca de fêmeas (Oliveira 2015; Oliveira e Schlindwein 2010; Oliveira *et al.*, 2012; Medeiros e Schlindwein, 2003, Dutra *et al.*, 2020).

Ao longo do dia, os voos de patrulha à procura de fêmeas nas flores de *C. elegans* ocupa o maior tempo dos machos de *H. missionica*. Durante as patrulhas, voam de flor para flor, reduzem a velocidade ligeiramente quando vistoriam as flores e somente pousam após numerosos sobrevoos no limbo das pétalas de alguma flor sem contatar estigma e estames no tubo floral. Desta maneira, as inspeções de flores durante os excessivos patrulhamentos com as pousadas de descanso nas flores não contribuem na polinização da planta. Somente ingestão de néctar que ocorre principalmente no início de tarde contribui na polinização de *C. elegans*.

Em outras espécies oligoléticas, a estratégia reprodutiva dos machos, no entanto, deve aumentar o fluxo de pólen entre flores coespecíficas como em *Arhysosage cactorum* (Andrenidae) no qual machos durante a patrulha em flores de *Parodia* e *Gymnocalycium* (Cactaceae) visitam cada flor e frequentemente utilizam o estigma como plataforma de pouso (Schlindwein e Wittmann 1995, Cerceau *et al.*, 2019). Contatos frequentes com estigmas são comuns em patrulhas de machos de *Melitoma segmentaria* (Apidae) em flores de *Ipomoea* (Convolvulaceae) onde essa espécie é oligolética (Pinheiro e Schlindwein, 1998, Pick e Schlindwein 2011), machos de *Bicolletes indigoticus* (Colletidae) em flores de *Blumenbachia insignis* (Loasaceae) (Siriani-Oliveira *et al.*, 2020) e machos de *Ancyloscelis* em flores de *Pontederia* e *Eichhornia* (Pontederiaceae) (Alves-dos-Santos e Wittmann, 1999).

Machos de *Callonychium petuniae* oligolética em *Petunia* e *Calibrachoa* no sul do Brasil (Wittmann *et al.* 1990) também contribuem com a polinização quando voam em posição de copula de flor para flor tocando anteras e estigmas (Wittmann *et al.* 1990). Desta maneira, as características comportamentais das estratégias reprodutivos dos machos nas flores das plantas hospedeiras das fêmeas definem o papel dos machos como polinizadores.

5.3. Qual o impacto do emprego de flores de *C. elegans* como dormitórios na formação de frutos e sementes?

Machos de *H. missionica* não polinizam as flores de *C. elegans* enquanto dormem nas flores, uma vez que cortam estames e estilete para se acomodarem na corola. O corte do estilete tem sido considerado impacto exclusivamente negativo para frutificação e formação de sementes (Stehmann e Semir, 2001; Danforth *et al.* 2019). No entanto, nosso estudo demonstra que flores já polinizadas quando os machos aplicam os cortes podem formar frutos de acordo com a idade da flor que foi escolhida para estabelecer o dormitório.

A amplitude dos horários na qual os machos cortam os estames e estiletos ocorre devido às variações nas condições ambientais do local, que são instáveis, portanto, machos podem cortar várias flores ao longo do dia (observação pessoal). Machos também se abrigam em condições ambientais adversas, quando chove ou esfria, ao longo do dia. Fêmeas também foram observadas cortando e dormindo em flores de *C. elegans* (observação pessoal).

Nas buscas de flores para dormitório, machos não apresentaram preferências por flores novas ou velhas (a partir do segundo dia). Isso é um fator importante a se considerar no impacto do corte de estames e estilete por machos em flores de *C. elegans*, uma vez que, como foi confirmada a hipótese do experimento “Frutificação de flores com corte manual de estames e estilete em diferentes horários”, flores de primeiro dia apresentam baixas taxas de frutificação, que ocorreram devido ao não crescimento do tubo polínico e consequente fecundação dos óvulos. Flores cortadas manualmente mais de 24h após a polinização, tiveram altas taxas de frutificação devido à germinação do pólen e o desenvolvimento do tubo polínico que já atingem o ovário e os óvulos após 24 horas, em polinização cruzada (Stehmann e Semir, 2001).

Flores cujos estames e estilete são cortados no segundo dia não são impactadas negativamente, uma vez que, mesmo cortadas, podem frutificar. Portanto, os machos causam um impacto negativo apenas nas flores de primeiro dia. Além disso, vimos que o número de sementes não varia entre os tratamentos, ou seja, mesmo com baixa taxa de frutificação, os frutos provenientes de flores de primeiro dia podem produzir a mesma quantidade de sementes que os frutos provenientes de flores de segundo dia.

Concluimos que o impacto causado por machos de *H. missionica* ao utilizar flores de *C. elegans* como dormitório é baixo e depende de uma série de fatores, como a idade floral e o tempo de corte dos estames e estilete. Além disso, os machos também exercem um papel de polinizadores complementares às fêmeas em *C. elegans*. Sugerimos estudos futuros sobre

análises detalhadas do comportamento dos machos de abelhas oligoléticas em outros sistemas e sua contribuição para avaliar o papel do macho como polinizador. Adicionalmente, é importante se estudar a estratégia reprodutiva dos machos detalhadamente para se entender seu sistema reprodutivo e sua relação com a planta e, conseqüentemente, com a polinização.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcock, J.; Barrows, E. M.; Gordh, G.; Hubbard, L. J.; Kirkendall, L.; Pyle, D. W.; Ponder, T. L. e Zalom, F. G. (1978). The ecology and evolution of male reproductive behaviour in the bees and wasps, *Zoological Journal of the Linnean Society*, 64(4), 293–326.

Alcock, J., Bailey, W. J. e Simmons, L. W. (2010) The mating system of *Amegilla* (Asaropoda) *paracalva* brooks (Hymenoptera: Apidae), *Journal of Insect Behavior*, 23(1), 69–79.

Alcock, J. e Buchmann, S. (2011) The Mating System of *Habropoda pallida* Timberlake (Anthophorinae: Apidae), *Journal of Insect Behavior*, 24(5), 348–362.

Almeida, E. A. B.; Pie, M. R.; Brady, S. G. e 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. e Wittmann, D. (1999). The Proboscis of the long-tongued *Ancyloscelis* bees (Anthophoridae/Apoidea), with remarks on flower visits and pollen collecting with the mouthparts, *Journal of the Kansas Entomological Society*, 72(3), 277–288.

Alves-dos-Santos, I. e Wittmann, D. (2000). Legitimate pollination of the tristylous flowers of *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) by *Ancyloscelis gigas* bees (Anthophoridae, Apoidea), *Plant Systematics and Evolution*, 223(3), 127–137.

Alves-dos-Santos, I.; Silva, C. I. da; Pinheiro, M. e Kleinert, A. de M. P. (2016). Quando um visitante floral é um polinizador? *Rodriguésia*, 67(2), 295–307.

Araujo, F. F. de, Oliveira, R., Mota, T., Stehmann, J. R., e Schlindwein, C. (2020). Solitary bee pollinators adjust pollen foraging to the unpredictable flower opening of a species of *Petunia* (Solanaceae), *Biological Journal of the Linnean Society*, 129(2), 273–287.

Ayasse, M., Gögler, J. e Stökl, J. (2010). Pollinator-driven speciation in sexually deceptive orchids of the genus *Ophrys*, in Glaubrecht, M. (ed.) *Evolution in Action: Case studies in Adaptive Radiation, Speciation and the Origin of Biodiversity*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 101–118.

Cane, J. H., Sampson, B. J. e Miller, S. A. (2011). Pollination Value of Male Bees: The Specialist Bee *Peponapis pruinosa* (Apidae) at Summer Squash (*Cucurbita pepo*), *Environmental Entomology*, 40(3), 614–620.

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

Cerceau, I.; Siriani-Oliveira, S.; Dutra, A. L.; Oliveira, R. e Schlindwein, C. (2019). The cost of fidelity: Foraging oligolectic bees gather huge amounts of pollen in a highly specialized cactus-pollinator association, *Biological Journal of the Linnean Society*, 128(1), 30–43.

CNCFlora. (2012) *Calibrachoa elegans* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Calibrachoa elegans](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Calibrachoa%20elegans)>. Acesso em 25/03/2020.

Dafni, A., Ivri, Y. e Brantjes, N. B. M. (1981). Pollination of *Serapias vomeracea* Briq. (Orchidaceae) by imitation of holes for sleeping solitary male bees (Hymenoptera), *Acta Botanica Neerlandica*, 30(1–2), 69–73.

Danforth, Minckley e Neff (2019) *The solitary bees: biology, evolution, conservation*.

1nd edn. Princeton: Princeton University Press.

Darwin C. 1862. *On the various contrivances by which British and foreign Orchids are fertilized*. London: Murray.

Dressler, R. L. (1982). Biology of the orchid bees (Euglossini), *Annual review of ecology and systematics.*, 13, 373–394.

Dutra, A. L., Schlindwein, C. e Oliveira, R. (2020). Females of a solitary bee reject males to collect food for offspring, *Behavioral Ecology*, 1–8.

Eltz, T., Sager, A. e Lunau, K. (2005). Juggling with volatiles: Exposure of perfumes by displaying male orchid bees, *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 191, 575–581.

Faegri, K. e Van der Pijl, L. (1979). *The principles of pollination ecology*. 3rd edn. Toronto, New York: Pergamon Press.

Fenster, C. B. *et al.* (2004). Pollination Syndromes and Floral Specialization, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35(1), 375–403.

Fregonezi, J. N. (2009). *História Evolutiva do gênero Calibrachoa La Llave & Lex . (Solanaceae)*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Fregonezi, Jeferson N., Turchetto, C., Bonatto, S. L., e Freitas, L. B. (2013). Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171(1), 140–153.

Gaglianone, M. C. (2000). Behaviour on flowers, structures associated to pollen transport and nesting biology of *Perditomorpha brunerii* and *Cephalurgus anomalus* (Hymenoptera: Colletidae, Andrenidae), *Revista de Biología Tropical.*, 48(1), 1–10.

Guarçoni, E. A. E., Paula, C. C. de e Costa, A. F. da (2010). Bromeliaceae do Parque Estadual da Serra do Rola-Moça, Minas Gerais, *Rodriguésia*, 61(3), 467–490.

Hammer Ø., Harper D. A. e Ryan P. D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis, *Palaeontologia electronica* 4(9).

Johnson, S.D. e Bond, W.J. (1994). Red flowers and butterfly pollination in the fynbos of South Africa. In *Plant–Animal Interactions in Mediterranean-type Ecosystems* (Arianoutsou, M. e Groves, R., eds), 137–148, Kluwer Academic Publishers.

Johnson, S. D., e Steiner, K. E. (2000). Generalization versus specialization in plant pollination systems, *Trends in Ecology and Evolution*, 15(4), 140–143.

Klein, A. M. *et al.* (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303–313.

Kullenberg, B. (1950). Investigations on the pollination of *Ophrys* species, *Oikos*, 2(1), 1–19.

Manning, J.C. e Goldblatt, P. (1997). The *Moegistorhynchus longirostris* (Diptera: Nemestrinidae) pollination guild: long-tubed flowers and a specialized long-proboscid fly pollination system in southern Africa, *Plant Systematics and Evolution*, 206, 51–69.

Medeiros, P. C. R. de e Schlindwein, C. (2003). Territórios de machos, acasalamento, distribuição e relação com plantas em *Protomeliturga turnerae* (Ducke, 1907) (Hymenoptera, Andrenidae), *Revista Brasileira de Entomologia*, 47(4), 589–596.

Michener, C. D. (1974). *The social behavior of the bees - a comparative study*,

Cambridge, Massachusetts, Belknap Press of Harvard University Press.

Michener, C. D. (2007). *The Bees of the World*. 2nd edn. The Johns Hopkins University Press. Baltimore.

Moure, J. S.; Graf, V. e Urban, D. (2012). Paracolletini Cockerell, 1934. In Moure, J. S., Urban, D. e Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - versão online. Disponível em <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em 25/03/2020.

Oglobin, A. (1948). Descripción de dos géneros nuevos de Paracolletini argentinos (Colletidae, Apoidea, Hymenoptera), *Notas del Museo de La Plata, Zoología*, 13(106), 165–177.

Oliveira, R. (2015). Estratégias de acasalamento em abelhas solitárias no Brasil: o que os machos fazer para se acasalar? In: Antonio J.C. Aguiar; Rodrigo B. Gonçalves; Kelli S. Ramos. (Org.). *Ensaio sobre as abelhas da Região Neotropical*. 1ed. Curitiba: Editora UFPR, , v. 1, 439-454.

Oliveira, R., Carvalho, A. T., e Schlindwein, C. (2012). Territorial or wandering: How males of *Protodiscelis palpalis* (Colletidae, Paracolletinae) behave in searching for mates, *Apidologie*, 43(6), 674–684.

Oliveira, R., Carvalho, A. T. e Schlindwein, C. (2013). Plasticity in male territoriality of a solitary bee under different environmental conditions, *Journal of Insect Behavior*, 26(5), 690–694.

Oliveira, R. e Schlindwein, C. (2010). Experimental demonstration of alternative mating tactics of male *Ptilothrix fructifera* (Hymenoptera, Apidae), *Animal Behaviour*, 80(2), 241–247.

Ollerton, J. *et al.* (2007). Multiple Meanings and Modes : On the Many Ways to Be a Generalist Flower, *Taxon*, 56(3), 717–728.

Parker, F. D. (1981). How efficient are bees in pollinating sunflowers?, *Journal of the Kansas Entomological Society*, 54(1), 61–67.

Parker, G. A. (1978). Evolution of competitive mate searching, *Annual Review of Entomology*, 23, 173–196.

Paulus, H. F. (2006). Deceived males – Pollination biology of the Mediterranean orchid genus *Ophrys* (Orchidaceae), *J. Europäischer Orchideen*, 38(2), 303–351.

Paxton, R. J. (2005). Male mating behaviour and mating systems of bees: an overview, *Apidologie*, 36, 145–156.

Pettersson, M.W. (1991). Pollination by a guild of fluctuating moth populations: option for unspecialization in *Silene vulgaris*, *Journal of Ecology*, 79, 591–604.

Pick, R. A., e Schlindwein, C. (2011). Pollen partitioning of three species of Convolvulaceae among oligolectic bees in the Caatinga of Brazil, *Plant Systematics and Evolution*, 293(1–4), 147–159.

Pinheiro, M., Alves-dos-Santos, I. e Sazima, M. (2017). Flowers as sleeping places for male bees: somehow the males know which flowers their females prefer, *Arthropod-Plant Interactions*. Springer Netherlands, 11(3), 329–337.

Pinheiro, M. e Schlindwein, C. (1998). A câmara nectarífera de *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae) e abelhas de glossa longa como polinizadores eficientes, *Iheringia, Serie*

Botanica, 51(1), 3–16.

Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H. T., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., Dicks, L. V., Garibaldi, L. A., Hill, R., Settele, J., e Vanbergen, A. J. (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being, *Nature*, 540(7632), 220–229.

Robertson, C. (1925). Heterotropic Bees, *Ecology*, 6(4), 412–436.

Rodrigues, D. M.; Caballero-villalobos, L.; Turchetto, C.; Jacques, R. A.; Kuhlemeier, C. e Freitas, L. B. (2018). Do we truly understand pollination syndromes in *Petunia* as much as we suppose? *AoB PLANTS*, 10, 1–15.

Roubik, D. W. (1995). *Pollination of cultivated plants in the tropics*. 1st edn. Balboa, Panama: FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Roubik, D. W. e Hanson, P. (2004). *Orchid bees of tropical America: Biology and Field Guide*. Inbio Press, Heredia, Costa Rica.

Sapir, Y., Shmida, A. e Ne'eman, G. (2005). Pollination of *Oncocyclops irises* (Iris: Iridaceae) by night-sheltering male bees, *Plant Biology*, 7(4), 417–424.

Schindwein, C. (2004). Are oligolectic bees always the most effective pollinators?, in *Solitary bees. Conservation, rearing and management for pollination*. Fortaleza: Imprensa Universitária, 285.

Schindwein, C. (2004). Abelhas Solitárias e Flores: Especialistas são polinizadores efetivos?, 1–8.

Schindwein, C. e Martins, C. F. (2000). Competition between the oligolectic bee *Ptilothrix plumata* (Anthophoridae) and the flower closing beetle *Pristimerus calcaratus* (Curculionidae) for floral resources of *Pavonia cancellata* (Malvaceae), *Plant Systematics and Evolution*, 224, 183–194.

Schindwein, C., e Wittmann, D. (1997). Stamen movements in flowers of *Opuntia* (Cactaceae) favour oligolectic pollinators, *Plant Systematics and Evolution*, 204, 179–193.

Simpson, B. B. e Neff, J. L. (1981). Floral rewards: alternatives to pollen and nectar, *Annals Missouri Botanical Garden*, 68(2), 301–322.

Siriani-Oliveira, S., Cerceau, I. e Schindwein, C. (2020). Specialised protagonists in a plant–pollinator interaction: the pollination of *Blumenbachia insignis* (Loasaceae), *Plant Biology*, 22(2), 167–176.

Siriani-Oliveira, S., Oliveira, R. e Schindwein, C. (2018). Pollination of *Blumenbachia amana* (Loasaceae): Flower morphology and partitioned pollen presentation guarantee a private reward to a specialist pollinator, *Biological Journal of the Linnean Society*, 124(3), 479–491.

Smith, G. P., Bronstein, J. L. e Papaj, D. R. (2019). Sex differences in pollinator behavior: Patterns across species and consequences for the mutualism, *Journal of Animal Ecology*, 88(7), 971–985.

Stebbins, G. L. (1970). Adaptive radiation of reproductive characteristics in Angiosperms, I: Pollination mechanisms, *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1(1), 307–326.

Stehmann, J. R. (1999). *Estudos taxonômicos na tribo Nicotianeae revisão de Petunia*. Universidade Estadual de Campinas.

Stehmann, J. R. e Semir, J. (2001). Biologia reprodutiva de *Calibrachoa elegans*

(Miers), *Revista brasileira de Botânica*, 24(1), 43–49.

Thornhill, R. e Alcock, J. (1983). *The evolution of insect mating systems*. Cambridge: Harvard University Press. 547.

Urban, D. e Graf, V. (2000). *Albinapis gracilis* gen.n. e sp.n. e *Hexanthea enneomera* sp.n. do Sul do Brasil (Hymenoptera, Colletidae, Paracolletini), *Revista Brasileira de Zoologia*, 17(3), 595–601.

Vereecken, N. J. *et al.* (2011). Integrating past and present studies on *Ophrys* pollination - a comment on Bradshaw *et al.*, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165(4), 329–335.

Viana, P. L. e Lombardi, J. A. (2007). Florística e caracterização dos campos rupestres sobre canga na Serra da Calçada, Minas Gerais, Brasil, *Rodriguésia*, 58(1), 159–177.

Vieira, A. L. C. (2019). *Interação especializada entre Calibrachoa elegans (Solanaceae) e abelhas polinizadoras*. Universidade Federal de Minas Gerais.

Wittmann, D., Cure, J. R. e Schifino-Wittmann, M. T. (1990). Coevolved reproductive strategies in the oligolectic bee *Callonychium petuniae* (Apoidea, Andrenidae) and three purple flowered *Petunia* species (Solanaceae) in southern Brazil, *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 28, 157–165.