



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ecologia,
Conservação e Manejo da Vida Silvestre



Plantas raras e ameaçadas de extinção - sucesso reprodutivo, interações com
polinizadores e implicações para a conservação

Juliana Ordones Rego

BELO HORIZONTE - MG

2017

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

**Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e
Manejo da Vida Silvestre**

**Plantas raras e ameaçadas de extinção - sucesso reprodutivo, interações com
polinizadores e implicações para a conservação**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre (ECMVS) da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor.

Juliana Ordones Rego

Orientador: Dr. Clemens Peter Schlindwein

Co-orientadora: Dra. Claudia Maria Jacobi

BELO HORIZONTE - MG

2017

ÍNDICE

Agradecimentos	04
Resumo	05
Abstract	07
Introdução	10
Capítulo 1 - Constant flower damage caused by a common stingless bee puts survival of a threatened buzz-pollinated species at risk	19
Capítulo 2 - Biologia reprodutiva de <i>Solanum graveolens</i> Bunbury (Solanaceae), espécie andromonóica, rara e ameaçada de extinção	46
Capítulo 3 - <i>Legrandia concinna</i> (Myrtaceae), espécie em perigo crítico de extinção, como recurso polínico para a relictual <i>Manuelia postica</i> (Apidae, Xylocopinae)	75
Considerações Finais	102

Agradecimentos

Aos meus pais, familiares e amigos por sempre me incentivarem e acreditarem em mim.

Aos meus orientadores Clemens Schlindwein e Claudia Jacobi, pelos preciosos ensinamentos e discussões, sempre incentivando a buscar e contar uma "estória bonita" da natureza.

Aos colegas do Grupo Plebeia, em especial a José Neiva e Paula Calaça pelas discussões e trocas de experiências. Ao colega e tutor Alberto Teixeira pela revisão do meu projeto e ricas discussões. A Reislá Oliveira pelas valiosas contribuições na discussão e análise estatística.

Aos colegas do Chile pela oportunidade e afetuosa acolhida, especialmente a Hugo Monzon e Ruben Garrido.

Aos colegas da Fundação Zoo-Botânica pelo apoio, incentivo e tolerância às minhas ausências. Especialmente ao Carlos Alberto pelo apoio em campo e boas conversas.

A PPG-ECMVS pelo rico ensinamento dos professores e prontidão dos funcionários Fred e Cris, todos sempre muito atenciosos. Em especial, ao Prof. Fernando Silveira pelos ensinamentos sobre ecologia de sementes.

Ao incentivo e apoio financeiro da ECMVS para participações em Congressos, apoio logístico da Fundação Zoo-Botânica e financeiro da FAPEMIG para trabalhos de campo.

Resumo

O conhecimento da biologia reprodutiva é fundamental para a conservação de plantas raras ou com distribuição restrita e a definição dos fatores limitantes para reprodução é particularmente importante para prever a viabilidade de populações de espécies ameaçadas. Este trabalho investigou as relações entre a estratégia reprodutiva e a raridade de três espécies ameaçadas de extinção: *Eriocnema fulva* e *Solanum graveolens*, endêmicas da Floresta Atlântica do Brasil e *Legrandia concinna*, endêmica da Floresta Decídua andina do Chile.

Visitantes ilegítimos de flores reduzem o sucesso reprodutivo de *E. fulva* (Melastomataceae). Em uma população com cerca de 50 indivíduos, abelhas de seis espécies visitaram suas flores, mas apenas três espécies coletaram pólen por vibração. A frequência de abelhas polinizadoras foi baixa enquanto abelhas operárias de *Trigona fulviventris* (Apidae), que danificam as flores, representavam 70% das visitas. Durante longas visitas, elas cortaram anteras para acessar o pólen, e muitas vezes também os estiletes. A baixa taxa de frutificação (6,9%) de *E. fulva* é uma consequência negativa direta do dano das flores pelas abelhas de *Trigona*, bem como seu impacto indireto, possivelmente tornando as flores pouco atraentes para polinizadores efetivos. Considerando a raridade desta espécie de planta, esses efeitos negativos colocam em risco a manutenção das populações de *E. fulva*.

Solanum graveolens é uma espécie andromonóica, as plantas possuem flores hermafroditas e estaminadas, e a função feminina é expressa em flores com estilete longo que cresce gradualmente do quarto ao sexto dia em 73% das flores. Em uma população com cerca de 30 indivíduos, fêmeas de dezessete espécies de abelhas visitaram as flores para coletar pólen: treze vibraram as anteras (79% das visitas) e

quatro não vibraram (21%). *Solanum graveolens* é uma espécie auto-incompatível e revela limitação de polinização. O sistema andromonóico apresentado por *S. graveolens* poderia funcionar bem se a população fosse maior, com maior possibilidade de cruzamentos, no entanto o número de plantas na população é reduzido e causa uma baixa taxa de frutificação. Assim, para proteger e conservar esta espécie, estratégias como aumentar o tamanho das populações, promover a conectividade entre elas e preservar seu habitat, incluindo as abelhas polinizadoras, devem ser implementadas.

Flores de *L. concinna* (Myrtaceae) são importantes para a reprodução de *Manuelia postica* (Apidae), que alimentam suas larvas com 82% de pólen desta espécie e, para o provisionamento de uma célula de cria utiliza em média 19 flores desta planta. Em uma população com 20 árvores, abelhas de três espécies visitaram as flores de *L. concinna*: *M. postica* (53%), *Bombus terrestris* (39%) e *Apis mellifera* (8%), com uma taxa de visitação baixa. *Manuelia postica*, única espécie nativa que visitou *L. concinna*, são abelhas pequenas, com baixo potencial de carga polínica, realiza visitas florais longas, não voam entre os indivíduos, pois completam sua escopa em poucas flores do mesmo indivíduo e ao visitar poucas flores contribui pouco para a polinização cruzada. Já *B. terrestris*, em menor frequência que *M. postica*, pode ser considerado o polinizador mais eficiente de *L. concinna*, pois realiza visitas curtas, possui uma maior capacidade de carga polínica e de voo entre indivíduos, e visita numerosas flores, geralmente contatando o estigma. A reintrodução de indivíduos de *L. concinna* seria recomendada para aumentar suas populações e os recursos polínicos para abelhas, uma vez que esta planta é fonte de uma grande quantidade destes recursos. *Manuelia postica* e possivelmente outras abelhas nativas, com mais recurso polínicos, e em maior frequência, poderiam potencializar as chances de polinização, melhorando o *fitness* desta espécie em estado crítico de ameaça.

Palavras-chave: planta ameaçada, polinização, sucesso reprodutivo, polinização por vibração, danos florais, andromonoiccia, provisão de pólen, conservação

Abstract

Knowledge of reproductive biology is essential for the conservation of rare or endemic plants, and the definition of limiting factors for reproduction is particularly important to predict the populations' viability of endangered species. This work investigated the relationships between the reproductive strategy and the rarity of three endangered species: *Eriocnema fulva* and *Solanum graveolens*, endemic to the Brazilian Atlantic Forest and *Legrandia concinna*, endemic to the andean Forest Deciduous of Chile.

Illegitimate flower visitors reduce the reproductive success of *E. fulva* (Melastomataceae). In a population with about 50 individuals, bees of six species visited their flowers, but only three species collected pollen by vibration. The frequency of pollinating bees was negligible while worker bees of *Trigona fulviventris* (Apidae), which damage flowers, accounted for 70% of visits. During lengthy visits, they cut anthers to access the pollen, and often styles as well. The low fruit set (6.9%) of *E. fulva* is a direct negative consequence of flowers damage by *Trigona* bees, as well as their indirect impact by making the flowers unattractive for effective pollinators. Considering the rareness of this plant species, these negative effects endanger the maintenance of the *E. fulva* populations.

Solanum graveolens is an andromonoecious species, the plants have hermaphrodite and staminate flowers, and the female function is expressed in flowers with a long style that grows gradually from the fourth to the sixth day in 73% of the flowers. In a population with about 30 individuals, females of seventeen species of bees visited the flowers to

collect pollen: thirteen vibrated the anthers (79% of visits) and four did not vibrate (21%). *Solanum graveolens* is a self-incompatible species and shows limited pollination. The andromonoecious system presented by *S. graveolens* could work well if the population was larger, with greater possibility of crossing, however the number of plants in the population is reduced and causes a low fruit set. Thus, to protect and conserve this species, strategies such as increasing population size, promoting connectivity among them and preserving their habitat, including pollinating bees, should be implemented.

Flowers of *L. concinna* (Myrtaceae) are important for the reproduction of *Manuelia postica* (Apidae), which feed their larvae with 82% of pollen of this species and to provisioning the cell breeding uses an average of 19 flowers of this plant. In a population with 20 individuals, bees of three species visited *L. concinna* flowers: *Manuelia postica* (53%), *Bombus terrestris* (39%) and *Apis mellifera* (8%), with a low visitation rate. *Manuelia postica*, the only native species that visited *L. concinna*, are small bees with low potential for pollen loading, lengthy flower visits, do not fly among individuals because they complete their scopas in few flowers of the same individual and by visiting few flowers, it contributes little for cross-pollination. While *B. terrestris*, less frequently than *M. postica*, can be considered the most efficient pollinator of *L. concinna* because it performs short visits, has a great capacity of pollen load, flies between individuals and visits numerous flowers, generally contacting the stigma. The reintroduction of *L. concinna* individuals would be recommended to increase their populations and the pollen resources for bees, since this plant is the source of a large amount of these resources. *Manuelia postica* and possibly other native bees, with more pollen resources, and more frequently, could potentiate the chances of pollination, improving the fitness of this critical threatened species.

Keywords: Threatened plant, pollination, reproductive success, buzz-pollination, flower damage, andromonoecy, pollen provisions, conservation

INTRODUÇÃO

A perda da biodiversidade mundial é uma grande preocupação global (Pimm *et al.* 1995, Hooper *et al.* 2012). O número de espécies vegetais incorporadas na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) e na Lista Oficial das espécies ameaçadas do Brasil é alarmante e requer medidas imediatas de conservação para salvaguardar muitas destas espécies (IUCN 2013, Martinelli & Moraes 2013).

Seguindo a política de atuar de acordo com as recomendações da Convenção das Nações Unidas sobre a Diversidade Biológica (CBD) e com as Estratégias Globais para Conservação das Plantas (GSPC) (CDB 2010, GPPC 2010), pesquisas com espécies raras, endêmicas e ameaçadas, são prioritárias para contribuir com a contenção da perda da biodiversidade.

Uma espécie é considerada rara baseada nos atributos de abundância local, distribuição geográfica e especificidade de hábitat (Rabinowitz, 1981; Kruckeberg & Rabinowitz, 1985) e endêmica quando ocorre em uma determinada área e em nenhuma outra além dela, sendo definida com base na amplitude da sua distribuição geográfica (Kruckeberg & Rabinowitz 1985). Nesse sentido, espécies raras e endêmicas são particularmente importantes devido ao seu alto risco de extinção, e devem ser alvos de conservação em vista de sua distribuição restrita, escassez e especificidade de hábitat.

Os critérios para a designação de espécies ameaçadas de extinção, estabelecidos mundialmente pela IUCN, são baseados no tamanho populacional e na distribuição geográfica. Consideram-se ainda ameaças externas, principalmente antropogênicas, tais como perda do habitat, introdução de espécies invasoras e extrativismo. No entanto, é

possível que fatores intrínsecos, incluindo o modo de reprodução, possam afetar sua vulnerabilidade. O conhecimento incompleto da biologia reprodutiva de muitas plantas raras e ameaçadas dificulta o conhecimento sobre o sucesso reprodutivo da espécie.

O conhecimento da biologia reprodutiva é fundamental para a conservação de plantas raras ou com distribuição restrita (Kruckeberg & Rabinowitz 1985, Kaye 1999, Evans *et al.* 2003, Vieira & Grabelos 2003). A definição dos fatores limitantes para reprodução é particularmente importante para prever a viabilidade de populações de espécies ameaçadas. Os fatores limitantes podem estar relacionados com a perda de flores e frutos, com a falta de polinizadores ou a baixa eficiência dos visitantes florais.

A conservação das plantas está aliada à conservação de seus polinizadores, já que a maioria de espécies de plantas com flores no mundo requerem animais polinizadores (Ollerton *et al.* 2011). Em sistemas de polinização que envolvem polinizadores especializados, a eliminação ou baixa abundância desses polinizadores deve resultar na diminuição da produção de frutos e sementes que pode causar o colapso populacional de determinada espécie de planta ameaçada. A magnitude da redução da taxa de fertilização está relacionada com o grau de dependência do polinizador (Lundgren *et al.* 2013). Há evidências de que os polinizadores estão em declínio em várias partes do mundo (Biesmeijer *et al.* 2006, Potts *et al.* 2010) devido, principalmente, à destruição dos habitats. Kearns *et al.* (1998) destacam que alguns estudos sobre plantas em risco de extinção têm mostrado a ausência de polinizadores efetivos, como em *Oenothera deltoides* (Onagraceae), *Primula sieboldii* (Primulaceae) e *Thelymitra epipactoides* (Orchidaceae).

A avaliação da relação inseto-polinizador pode apontar se há deficiência na transferência de grãos de pólen para o estigma e na taxa de frutificação da planta e,

desta maneira, pode contribuir para o manejo e a conservação de plantas ameaçadas. Plantas com anteras poricidas são polinizadas por fêmeas de abelhas que coletam pólen através da vibração das anteras, chamado de *buzz-pollination* ou polinização por vibração (Buchmann 1983). Anteras poricidas conferem proteção ao pólen e diminuem a sua perda, pois escondem os grãos de pólen e os direcionam para um local específico no corpo do polinizador, além de limitar o espectro de visitantes florais a espécies de abelhas capazes de vibrar as anteras para extrair o pólen (Westerkamp, 1996; Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 1988; Cane & Buchmann, 1989; Almeida et al., 2013; Solis-Montero & Vallejo-Marin, 2017). Em geral, essas abelhas são os polinizadores efetivos das plantas com anteras poricidas, como ocorre em espécies de Melastomataceae (Renner 1989, Goldenberg & Shepherd 1998, Goldenberg & Varassin 2001, Harter *et al.* 2002, Nunes-Silva *et al.* 2010) e Solanaceae (Buchmann 1983, Buchmann & Cane 1989, Bezzera & Machado 2003, Dupont & Olsen, 2006; Quesada-Aguilar et al., 2008, Anderson et al 2014, Burkart et al., 2014).

A perda de plantas fonte de pólen revela ser o fator chave que impulsiona o declínio das abelhas, e estratégias de mitigação deste declínio só serão efetivas se forem direcionadas a conservação destas plantas (Scheper et al., 2014). Em geral, espécies da família Myrtaceae possuem estames numerosos e fornecem uma grande quantidade de pólen que pode ser fonte de alimento para muitas abelhas.

Este trabalho investigou as relações entre a estratégia reprodutiva e a raridade de três espécies ameaçadas de extinção. Foram avaliadas as etapas que incluem desde a produção de flores até a formação de frutos, visando contribuir para o entendimento das causas da raridade e possibilidade de permanência dessas espécies em seus ambientes.

As espécies são as seguintes:

Eriocnema fulva Naudin (Melastomataceae) é uma erva perene, ameaçada de extinção, classificada como “vulnerável” segundo a lista de espécies ameaçadas brasileira (MMA 2014). É uma espécie muito rara, que cresce em paredões rochosos próximos a cursos d’água na região do Quadrilátero Ferrífero, sudeste do Brasil.

Solanum graveolens Bunbury (Solanaceae) é um arbusto perene com até 1,50 m de altura, ameaçada de extinção, classificada como “em perigo” de extinção segundo a lista de espécies ameaçadas brasileira (MMA 2014). Ocorre em sub-bosques da Floresta Atlântica, é rara, e apesar dos registros disjuntos que ampliam sua distribuição nos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro, poucas populações são conhecidas.

Legrandia concinna (Phil.) Kausel (Myrtaceae) é uma árvore com até 8 m de altura, rara, endêmica e ameaçada de extinção, na categoria de ameaça "em perigo crítico" (Hechenleitner et al. 2005). Ocorre próxima a locais úmidos em florestas de roble (*Nothofagus spp.*) em uma faixa estreita e curta da precordilheira andina do Chile.

Referencias

Almeida, N.M., Castro, C.C., Novo, R.R., Leite, A.V., Machado, I.C. (2013) Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly? *Annals of Botany* 112, 1117-1123

Anderson, G.J., Bernadello, G., Santos-Guerra, A. (2014) Reproductive biology of *Solanum vespertilio* (Solanaceae), a zygomorphic, heterantherous, enantiostylous, and andromonoecious rare Canary Islands endemic. *Plant Systematics and Evolution*. DOI 10.1007/s00606-014-1143-4

- Bezerra, E.L.S., Machado, I.C. (2003) Biologia floral e sistema de polinização de *Solanum stramonifolium* Jacq. (Solanaceae) em remanescente de Mata Atlântica, Pernambuco. *Acta Botanica Brasilica* 17(2), 247-257
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, 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
- Buchmann, S.L. (1983) Buzz pollination in Angiosperms. Pp. 73-113. In: Jones, C.E., Little, R.J. (Eds.). *Handbook of experimental pollination biology*. Van Nostrand & Reinhold, New York
- Buchmann, S.L., Cane, J.H. (1989) Bees assess pollen returns while sonicating *Solanum* flowers. *Oecologia* 81, 289-294
- Burkart, A., Schlindwein, C., Lunau, K. (2014) Assessment of pollen reward and pollen availability in *Solanum stramonifolium* and *Solanum paniculatum* for buzz-pollinating carpenter bees. *Plant Biology* 16, 503-507
- Cane, J.H., Buchmann, S.L. (1989) Novel Pollen-Harvesting Behavior by the Bee *Protandrena mexicanorum* (Hymenoptera: Andrenidae). *Journal of Insect Behavior* 2(3), 431-436
- Convention on Biological Diversity (CBD). (2010) *Global Strategy for Plant Conservation, 2010–2020*. Sixth Ordinary Meeting of the Conference of the Parties to the Convention on Biological Diversity (UNEP/CDB/COP10/19), Nagoya, Japan. <<http://www.cbd.int/dxidion/cop/?id=12268>, acesso em 13 junho 2012

Dupont, Y.L., Olensen, J.M. (2006) Andromonoecy and buzz pollination in *Solanum species* (Solanaceae) endemic to the Canary Islands. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 63(1), 63-66

Evans, M.E.K., Menges, E.C., Gordon, D.R. (2003) Reproductive biology of three sympatric endangered plants endemic to Florida scrub. *Biological Conservation* 111, 235-246

Global Partnership for Plant Conservation (GPPC). (2010) Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). <http://www.plants2020.net/gspc-targets/>, acesso em 6 junho 2012

Goldenberg, R., Shepherd, G.J. (1998) Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in cerrado vegetation. *Plant Systematics and Evolution* 211, 13-29

Goldenberg, R., Varassin, I.G. (2001) Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, Jundiáí, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 24, 283-288

Gottsberger, G., Silberbauer-Gottsberger, I. (1988) Evolution of flower structures and pollination in Neotropical Cassiinae (Caesalpiaceae) species. *Phyton (Austria)* 28, 293-320

Harter, B., Leistikow, C., Wilms, W., Truylio, B., Engels, W. (2002) Bees collecting pollen from flowers with poricidal anthers in a south Brazilian Araucaria forest: a community study. *Journal of Apicultural Research* 41, 9-16

Hechenleitner, P., Gardner, M.F., Thomas, P.I., Echeverría, C., Escobar, B., Brownless, P., Martínez, C. (2005) Plantas amenazadas del Centro-Sur de Chile. *Distribución,*

conservación y propagación. Univ. Austral de Chile, Real Jardín Botánico Edimburgo, 187 pp

Hooper Du, Adair, E.C., Cardinale, B.J., *et al.* (2012) A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. *Nature* 486, 105-108

International Union for the Conservation of Nature, IUCN. (2013) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Disponível em www.iucnredlist.org. Acesso em 05/03/2013

Kaye, T.N. (1999) From flowering to dispersal: reproductive ecology of an endemic plant, *Astragalus australis* var. *olympicus* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 86, 1248-1256

Kearns, C.A., Inouye, D.W., Waser, N.W. (1998) Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29(1), 83-112

Kruckeberg, A.R., Rabinowitz, D. (1985) Biological aspects of endemism in higher plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 16, 447-479

Lundgren R., Lázaro A., Totland O. (2013) Experimental pollinator decline affects plant reproduction and is mediated by plant mating system. *Journal of Pollination Ecology* 11, 46-56

Ministério do Meio Ambiente (MMA) (2014) Portaria No 443, de 17 de Dezembro de 2014. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em 26/02/2014

Martinelli, G., Moraes, M.D. (eds). (2013) Livro vermelho da flora do Brasil. 1ª ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio-Jardim Botânico do Rio de Janeiro

Nunes-Silva, P., Hrcir, M., Imperatriz-Fonseca, V.L. (2010) A Polinização por Vibração. *Oecologia Australis* 14, 140-151

Ollerton, J., Winfree, R., Tarrant, S. (2011) How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120,321-326

Pimm S.L., Russell G.J., Gittleman J.L., Brooks T.M. (1995) The future of biodiversity. *Science* 269, 347-350

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(6), 345-353

Quesada-Aguilar, A., Kalisz, S., Ashman, T.-L. (2008) Flower morphology and pollinator dynamics in *Solanum carolinense* (Solanaceae): implications for the evolution of andromonoecy. *American Journal of Botany* 95(8), 974-984

Rabinowitz, D. 1981. Seven forms of rarity. In: Synge, H. (Editor). *The biological aspects of rare plant conservation*. John Wiley, Chichester, UK. Pages 205-217

Renner, S. (1989) A survey of reproductive biology in neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76, 496-518

Scheper, J., Reemer, M., van Kats, R., Ozinga, W.A., van der Linden, G.T.J., Schaminée, J.H.J., Siepel, H., Kleijn, D. (2014) Museum specimens reveal loss of

pollen host plants as key factor driving wild bee decline in The Netherlands. Proceedings of the National Academy of Sciences 111, 17552-17557

Stehmann, J.R., Forzza, R.C., Salino, A., Sobral, M., Costa, D.P., Kamino, L.H.Y. (2009) Plantas da Floresta Atlântica. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro

Solis-Montero, L., Vallejo-Marin, M. (2017) Does the morphological fit between flowers and pollinators affect pollen deposition? An experimental test in a buzz-pollinated species with anther dimorphism. Ecology and Evolution 7(8), 2706-2715

Vieira, M.F., Grabelos, R. (2003) Sistema reprodutivo de *Oxypetalum mexiae* Malme (Asclepiadaceae), espécie endêmica de Viçosa, MG, Brasil, em perigo de extinção. Acta Botanica Brasilica 17, 137-145

Westerkamp, C., (1996) Pollen in bee flower relations: some considerations on melittophily. Botanica Acta 109, 325–32

Capítulo 1 – Constant flower damage caused by a common stingless bee puts survival of a threatened buzz-pollinated species at risk *

Juliana Ordones Rego¹, Reislá Oliveira², Claudia Maria Jacobi², Clemens Schindwein³

¹ Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Brazil

² Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Brazil

³ Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-910 Belo Horizonte, Brazil

Corresponding author: schindw@gmail.com, +55 31 34093026, +55 31 34092671
(Fax)

Short title: Flower damage in a threatened species caused by *Trigona*

* Artigo publicado no periódico Apidologie (2017)

Abstract

Illegitimate flower visitors may reduce the reproductive success of their host plants. *Eriocnema fulva*, a threatened Melastomataceae of the Atlantic Forest, Brazil, has pollen flowers with poricidal anthers that show frequent damage of floral parts. We identified the flower-damaging bees and determined their impact on fruit set. Bees of six species visited their flowers, but only three species collected pollen by vibration. With only one visit to a flower patch per 12 hours, the frequency of effective buzz

pollinating bees was negligible, while flower-damaging workers of the stingless bee *Trigona fulviventris* (Apidae) accounted for 70% of the visits. During their lengthy visits, they cut anthers to access pollen, and often styles as well. We conclude that the direct negative consequence of flower damage by *Trigona* bees, as well as their indirect impact by making the flowers unattractive for effective pollinators is a major reason for the low fruit set (6.9%) of *E. fulva*. Considering the rareness of the plant species, these negative effects put the survival of *E. fulva* at risk.

Keywords: destructive flower visits / Meliponini / pollen robbers / reproductive success / *Trigona*

Introduction

Plant species that are threatened with extinction usually occur in small, sparse populations in fragmented and specialized habitats under negative anthropic impacts. Knowledge of the reproductive biology of rare or threatened plants, especially regarding factors that limit sexual reproduction, is fundamental for their conservation (Kruckeberg and Rabinowitz 1985; Evans et al. 2003). Pollination limitation is expected to be more accentuated in these species due to the scarcity of reproductive partners, greater distances between individual plants, and reduction of pollinator abundance due to the lower availability of floral resources (Potts et al. 2004; Roulston and Goodell 2011).

Factors that limit pollination in common and rare species may be related to pollen loss to the environment or to pollen consumers (Schlindwein et al. 2005), florivory (Ferreira and Torezan-Silingardi 2013), lack of pollinators, or poor efficiency of floral visitors (Kearns et al. 1998; Wilcock and Neiland 2002). Herbivores that feed on flowers affect

the reproductive success of plants by reducing the availability of pollen, ovules, and pistils (Krupnick et al. 1999; Canela and Sazima 2003).

Among bees, workers of genus *Trigona* (Apidae, Meliponini) are known to damage flowers of several plant species when they collect pollen or nectar (Renner 1983; Gottsberger and Silberbauer-Gottsberger 1988; Tezuka and Maeta 1995). It has been demonstrated that in some cases this damage has reduced the plants' reproductive success (Sazima and Sazima 1989; Milet-Pinheiro and Schlindwein 2009; Schlindwein et al. 2014). Worker bees of *Trigona* damage flowers because they cannot reach hidden nectar resources due to their short mouthparts or because they cannot collect pollen legitimately in flowers with poricidal anthers. In these anthers, pollen grains are hidden and released by apical pores only after vibration of the anthers by female bees (*buzz-pollination*, Buchmann 1983; Fracasso and Sazima 2004; Nunes-Silva et al. 2010; De Luca and Vallejo-Marín 2013; Burkart et al. 2014). This mechanism diminishes pollen loss to the environment and opportunistic consumers, and favors the effective pollinating buzz-pollinators (Endress 1994).

In species with poricidal anthers, such as representatives of Melastomataceae and Cassiinae (Fabaceae), workers of *Trigona*, who do not vibrate flowers to collect pollen (Buchmann 1983; De Luca and Vallejo-Marín 2013, Mesquita-Neto et al. 2017), harm anthers while obtaining access to pollen (Wille-Trejos 1963; Renner 1983; Gottsberger and Silberbauer-Gottsberger 1988). However, the impact that this damage has on the reproductive success of these species has not been assessed even though it would be particularly relevant for plant species that are threatened with extinction.

Eriocnema fulva Naudin (Melastomataceae) is a rare, threatened species with poricidal anthers, classified as "Vulnerable" in the Brazilian list of threatened species (MMA

2014). There are records of only four populations, all with distribution restricted to rocky cliffs close to small water bodies in the Quadrilátero Ferrífero (Iron Quadrangle) (Andrade 2009), a region in southeast Brazil under heavy anthropic impact derived from iron ore mining (Jacobi & Carmo 2008; Jacobi et al. 2011). Studies on the floral biology of *E. fulva* have detected frequent damage to its flowers (Andrade et al. 2007a).

Focusing on the effect of flower damage on fruit development of this threatened species, we ask: who are the floral visitors of *E. fulva* and who among them cause damage to floral tissues? Which flower parts are damaged and at what rate? What are the effects of floral damage on fruit set?

Materials and methods

Study area

The study was conducted during three flowering seasons of *E. fulva* (November to February) between 2013 and 2016. Data collection was more intense in the flowering season of 2013/2014 and 2014/2015, with about seven non-consecutive days per month. The studied population was located within an environmental protection area south of the Belo Horizonte Metropolitan Region (APA-Sul RMBH), at 20°08'17.3'S, 43°47'34.6' W, and 753 m altitude, in the state of Minas Gerais, Brazil.

This protected area is situated within the Quadrilátero Ferrífero (Iron Quadrangle) of the southern Espinhaço Mountain Range, which is one of the most diverse regions of Brazil as well as a center of endemism for several plant groups (Giulietti et al. 1997). The Quadrilátero Ferrífero lies in the transition zone between the Atlantic Forest and the Cerrado, two global biodiversity hotspots (Myers et al. 2000). Its rocky outcrops cover important iron ore deposits and are thus directly exposed to irreversible interventions of

great magnitude in the form of opencast mining, creating a situation that puts the associated biota at immediate risk (Jacobi and Carmo 2008; Jacobi et al. 2011). Due to the great number of endemic plants and the constant pressure from mining, urban expansion and wildfires, the Quadrilátero Ferrífero was included among the Priorities for Biodiversity Conservation of the state of Minas Gerais (Drumond et al. 2005).

The climate of the region is characterized by humid summers with heavy rainfalls (November to February) and drier mild winters. Annual mean temperature is 21°C and mean annual precipitation is 1500 mm (Ramos et al. 2009).

Study species

Eriocnema fulva is a perennial herb with simple or bifurcated stems, opposite pilose leaves and red-pilose petioles. The flowers have a diameter of 10 mm, five white petals and ten stamens of 5 mm in length with poricidal anthers. The pistil has a style somewhat longer than the stamens with a small and poorly delimited stigma. The species is self-compatible, but does not produce fruits by spontaneous self-pollination (Andrade et al. 2007a). Fruit set after cross-pollination was about 3-fold when compared to geitonogamous pollination in that population, and the plants suffered pollinator limitation. We focused our study on the population that occurs on steep, rocky, humid and shadowy slopes at the margins of the “Das Velhas” river along an unpaved road. This population contains about 50 individuals in an area of roughly 300 m² and is surrounded by closed species-rich secondary Atlantic Forest. The habitat of the river slopes is composed of few species co-flowering with *Eriocnema fulva*, such as shrubs and herbs of *Anetanthus gracilis* Hiern (Gesneriaceae), *Manettia pubescens* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae) *Manihot* sp. (Euphorbiaceae), *Pombalia setigera* (A.St.-

Hil.) Paula-Souza (Violaceae), *Psychotria* sp. (Rubiaceae) and *Stemodia microphylla* J.A.Schmidt (Plantaginaceae).

Floral Biology

The number of inflorescences, flowers/inflorescence and seeds/fruit were determined for 11 tagged plants. Anthesis duration, anther dehiscence, and floral longevity were determined in 20 flowers from different plants. We monitored 119 individually marked flowers from ca. 35 plants to characterize color changes of the different floral parts throughout anthesis.

To calculate the pollen/ovule ratio, the number of pollen grains per flower was assessed with a Neubauer chamber. For this, we fixed 20 pre-anthesis buds from different individuals in ethanol 70%. The stamens of each bud were placed in Eppendorf tubes containing a solution of 0.5 ml lactic acid and glycerin at 3:1. They were then macerated and agitated for 2 minutes in a vortex agitator. An aliquot was then transferred to the Neubauer chamber and the pollen grains counted to estimate the total number of pollen grains per flower (Dafni et al. 2005). In the same buds we counted the ovules under a stereomicroscope and then calculated the pollen/ovule ratio.

Voucher specimens were deposited in the herbaria of Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB 180801) and Jardim Botânico da Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte (BHQB 10404).

Floral visitors

The frequency of floral visitors was determined from a total of 63 hours of continuous field observations made between 0800 h and 1700 h during non-consecutive days,

between December and January, in the flowering season of 2013/2014 (four days) and 2014/2015 (three days). Continuous observations were done in focal patches (1-2 m²) of the population where there were the most open flowers each day (*ca.* 45-50) due to the scarcity of floral visitors. We recorded the time and length of visits, and classified the pollen-gathering behavior as: (1) bees that vibrate anthers, (2) bees that gather pollen from the surface of petals and stamens, and (3) bees that gather pollen by cutting anthers. Floral visitors were collected and deposited in the Entomological Collection of UFMG (Centro de Coleções Taxonômicas da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil).

Floral damage

We characterized the behavior of bees that damaged flowers according to the duration of visit, damage to style, and number of anthers damaged. Bees were filmed and photographed.

To determine the degree of floral damage at different stages of anthesis, we labeled flowers individually in 2014 and 2015 and quantified: (1) the percentage of anthers and styles damaged (N=109, 2014; N=140, 2015); (2) the stage of anthesis at which the damage occurred (N=109, 2014); (3) the fruiting rate of damaged and intact flowers (N=109, 2014; N=140, 2015); and (4) the number of seeds per fruit formed. Fruits were collected two months after anthesis. To determine the stage of anthesis at which the flowers were damaged we recorded the color of filaments, styles and the base of petals on a daily basis.

To evaluate the constancy of flower damage by *Trigona* bees to the population, we counted the number of damaged anthers and styles during four weeks in the season flowering peak, between December 2014 and January 2015, in 70 flowers per week.

Statistical analyses

We used a general linear model (GLM) with quasipoisson distributed errors and a log link function to compare the number of anthers damaged in each of the four consecutive weeks, and a GLM with binomial distributed errors and a logit link function to compare the number of damaged styles in the same period. We compared the number of seeds produced by style-damaged and style-undamaged flowers using a GLM with binomial negative distribution, and log function.

We used logistic regression (Agresti, 2007) to analyze the effects of anther and style damage on fruit set. We calculated a logit link function with fruit set as binary response variable (1=fruit production; 0=no fruit production). The independent variables were number of damaged anthers (0-10 anthers) and damage to style (coded as binary; 0=damage; 1=no damage). We computed a complete model with both independent variables and the interaction included. As the interaction between damage to anther and style had no significant effect on fruit set, we simplified the model removing the interaction. All analyses were computed with R package (R Core Team 2015).

Results

Floral Biology

Eriocnema fulva bloomed from November to January, and the fruits released seeds from February to June. Individuals produced an average of 4.4 (SD=3.3; range=1-11; N=11)

inflorescences, and each of these developed 2.9 (SD=1.7; range=1-7; N=48) flowers. A total of 41 buds (22.6%, N=181) were aborted. Individuals produced an average of 2.3 (SD=2.8; range=0-8; N=11) fruits (N=20) with 130.6 ± 46.2 seeds, measuring approximately 2 mm in length.

Flowers opened throughout the day, between 0800 h and 1700 h. The style was already erect when the petals spread. The stamens remained folded with the apex of the anthers hidden towards the base (Fig. 1a). About 30-40 min after onset of anthesis, the stamens unfolded to their final position, with the apical pores already open (Fig. 1b).

Flowers lasted 4-5 days. At the start of anthesis, the petals were white with yellow bases, and the filaments and styles were yellow. On the second and third days, the yellow petal bases, filaments and styles changed gradually to orange and orange-red, and to completely red on the fourth day (Fig. 1c). Stamens and petals began to fall on the fourth day. Each flower (N=20) produced $77,262 \pm 38,802$ pollen grains and 248 ± 53.5 ovules. The pollen/ovule ratio was 328:1.

Floral visitors

Females of six bee species visited the flowers of *E. fulva*: three Augochlorini (Halictidae), two stingless bees (Apidae, Meliponini) and one *Ceratina* (Apidae, Ceratinini), all small to minute in size (Tab 1). Only females of *Augochloropsis* collected pollen by vibration. They vibrated the anthers individually and were the only visitors that contacted the stigma. Workers of the stingless bee *Tetragonisca angustula* and females of *Ceratina* (*Ceratinula*) sp., both with minute body sizes, gathered pollen grains from the surface of petals, anthers and filaments after vibration-buzzing by the other species. Workers of *T. fulviventris* cut the anthers to obtain pollen.

Floral visitors were extraordinarily rare: throughout the entire 63 hours of observation in focal patches of 45-50 flowers only 46 bees were recorded. *Augochloropsis* appeared exclusively in the afternoon (1200 h–1700 h), *Tetragonisca angustula* and *Ceratina* in the late morning and in the afternoon (1100 h-1500 h), and workers of *T. fulviventris*, the most frequent visitors, appeared throughout the entire day.

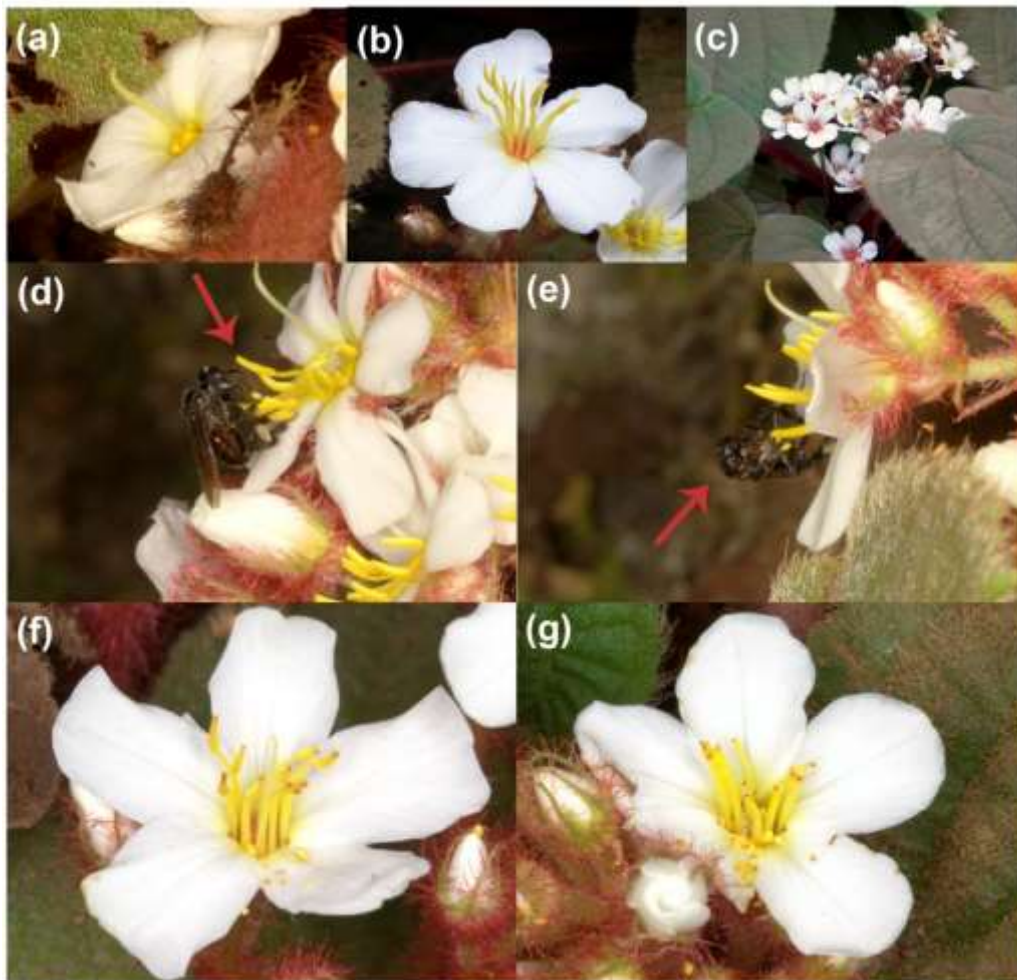


Fig. 1 Flowers of *Eriocnema fulva* throughout anthesis (a-c). (a) Freshly opened flowers with anthers still hidden, oriented towards the base of the flower; base of petals and entire styles yellow; (b) flower at the end of the first day of anthesis with the stamens unfolded; base of petals yellow, bases of filaments and styles orange; the flower to the right just after flower opening with the unfolding stamens; (c) inflorescence with

several open flowers, most at the end of anthesis with petal bases, filaments and styles red. Pollen collection by a worker *Trigona fulviventris* in a freshly opened flower and flower damage (d-g). (d) Insertion of mouth parts into an anther to collect pollen; (e) worker cutting an anther; most of the anthers of this flower have already been partially cut, style with stigma still intact; (f) flower with partially cut anthers; the cut slices fallen on the petals; (g) flowers with cut anthers and style.

Table 1 Flower visitors of *Eriocnema fulva* during three flowering seasons (2013-2016)

Floral visitors	Sex	Pollen collection	Body length (mm)	Stigma contact
Apidae				
Ceratinini				
<i>Ceratina (Ceratinula) sp.</i>	♀	Gleaning	4.0-4.3	No
Meliponini				
<i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille, 1811)	♀ ♀	Gleaning	3.6-3.8	No
<i>Trigona fulviventris</i> Guérin 1844		Anther cutting	6.4-6.7	Occasionally
Halictidae				
Augochlorini				
<i>Augochloropsis sp.1</i>	♀	Buzzing	6.0-6.3	Yes
<i>Augochloropsis sp.2</i>	♀	Buzzing	6.1-6.3	Yes
<i>Augochloropsis sp.3</i>	♀	Buzzing	7.0-7.3	Yes

Floral damage

To collect pollen, the worker bees of *T. fulviventris* inserted their glossa and labial palpi into the anther pore (Fig. 1d), withdrew the mouthparts and removed the adhering pollen grains with their front legs and placed them on the ventral part of the thorax. After several transfers of pollen grains to the thorax, they moved the accumulated pollen with their mid-legs to the corbiculae on the hind tibia. They repeatedly made transverse cuts with their mandibles (Fig. 1e) to reach the pollen grains located deeper within the

anther. The cut anther slices frequently dropped and accumulated at the petal bases (Fig. 1f, g). After each cut, the bees reintroduced the mouthparts into the cut anthers. The worker bees collected pollen from the different anthers in a uniform manner. In addition to anthers, they also frequently cut filaments and styles (Fig. 1g).

When workers of *T. fulviventris* arrived at a flower patch with an empty scopa, they usually visited 3-4 flowers to collect pollen. They remained on the flowers for an average of 185 seconds (SD=145, range 20-635, N=23), and took 47 ± 26 seconds to collect pollen from each anther (range 28-103, N=11). This period corresponds to one, two or three pollen gatherings separated by one or two cuts to the same anther.

Flower damage by *T. fulviventris* occurred mainly on the first day of anthesis, when filaments, petal bases and styles were still yellow. On the first day of anthesis 81.5% of the anthers and 61.1% of the styles were damaged (N= 109 flowers). At the end of anthesis, 98.3% of the flowers showed anther damage and 76.9% style damage in two years of observation (N=280). Most flowers had damage to all ten stamens by the end of anthesis: 92.4% of flowers in 2015 (N=109) and 82.5% in 2016 (N=280).

Flower damages occurred continuously during the peak flowering of *E. fulva*. In the two first weeks of monitoring, anther and style damages were more intense (9.8 anthers damaged per flower) than in the two subsequent weeks (8.9 anthers damaged) (GLM with quasipoisson error $F=6.931$; $DF=276$; $P<0.001$; for style damage - GLM with binomial error $\chi^2=9.850$; $DF=276$; $P=0.019$). The percentage of damaged styles varied between 53 and 76% during the period.

Effect of floral damages on fruit set

In the two years of observation fruit set was 6.5% (2013/2014; N=92 flowers) and 7.1% (2014/2015; N=140 flowers). The logistic regression model showed that damage on either style or anthers significantly reduced the probability of *E. fulva* setting fruit. The chances of a flower setting fruit decreased 4-fold when the style was damaged and was less than 10% when all anthers were damaged (Table 2; Fig. 2). The mean of fruit set is 0,04 fruits (SD=0,19, N= 176) for flowers with style damage and 0,16 (SD=0,37, N=56) for flowers without style damage.

Table 2 Summary of logistic regression models explaining the effects of damage on anther and styles on the probability of *Eriocnema fulva* flowers to set fruit (N = 232)

Variables in the model	$\beta \pm SE$	Z	P	Exp(β)
Fruit set				
Model 1				
Anthers	-0.129 \pm 0.107	-1.208	0.044*	0.888
Style	-2.653 \pm 4.586	-0.578	0.020*	0.070
Anthers:Style	0.136 \pm 0.467	0.291	0.742	1.145
Model 2				
Anthers	-0.119 \pm 0.102	-1.166	0.044*	0.888
Style	-1.341 \pm 0.566	-2.368	0.020*	0.262

* Significant at 5%

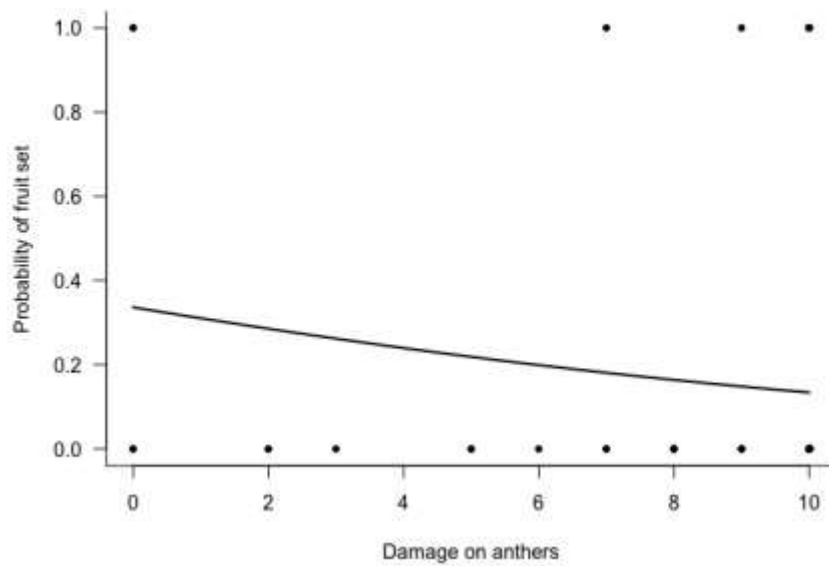


Fig. 2 Predicted fruit set per flower of *Eriocnema fulva*, calculated from logistic regressions, after damage on none to all anthers.

The average seed number in fruits resulting from flowers with damaged anthers only (145.7 ± 70.86 , $N=6$) did not differ significantly from that with both style and anthers damaged (131.4 ± 71.54 , $N=6$; GLM with binomial error $\chi^2 = 0.142$; $DF= 10$; $P= 0.706$).

Discussion

The individuals of *Eriocnema fulva* had a constant, very low fruit set rate throughout two reproductive seasons. Considering the rarity of the plant species due to habitat loss (Baumgratz et al. 2013), this low fruit set caused by floral damages of *Trigona fulviventr* is critical for the survival of the species. Visits by this bee reduced fecundity directly by removing anthers and stigma, and indirectly by consuming pollen, which would otherwise be available for effective pollinators. This pollen loss also reduces the potential for these flowers to serve as pollen donors, thereby reducing the male component of fitness.

Direct negative effect of *Trigona* on fruit production of *E. fulva*

Workers of several species of *Trigona*, bees widely distributed throughout Central and South America, are known as detrimental floral visitors because they destroy flowers, rob nectar and/or defend floral resources against other bee species. During pollen larceny they usually cut anthers and styles with the mandibles, with direct negative effects on the reproductive success and fitness of the plants that provide pollen resources (Sazima and Sazima 1989; Milet-Pinheiro and Schlindwein 2009; Schlindwein et al. 2014). Unable to access pollen legitimately via vibration, workers of *T. fulviventr*is not only cut the anthers, but also cut the styles in 75% of the flowers of *E. fulva* they damage. In this way, they directly affect ovule fecundity by precluding pollen germination in the stigma or pollen-tube growth in the style. When fruit set in styles with damaged stigmata occurred, *Trigona* workers presumably cut the style after pollen tubes had already reached the ovary. Usually, this happens in less than 24 hours after pollen deposition in Melastomataceae (Santos et al. 2012). Fruit set was low in flowers with cut styles as well as with intact stigma but with cut anthers. This demonstrates that workers of *T. fulviventr*is do not even contribute to flower self-pollination in *E. fulva*.

Indirect negative effect of *Trigona* on fruit production of *E. fulva*

Despite the slow and harmful pollen gathering performed by workers of *Trigona*, they must have efficiently removed almost all the pollen resource produced by the population of *E. fulva*, when taken into account damage rates (98%) and the relative abundance of floral visits (70%). This permanent low availability of pollen in the flowers must have discouraged floral visits by effective pollinators. During 12 hours, on average, only one single pollinating/vibrating bee (*Augochloropsis* sp.) was recorded on flowers of *E. fulva*.

Removal of pollen that involves damage to floral parts by workers of *Trigona* lasts much longer (up to more than 10 min) than visits of bees that handle flowers legitimately (Renner 1983; De Luca and Vallejo-Marín 2013; Schlindwein et al. 2014), because the worker bees must spend time chewing floral tissues and making consecutive cuts associated with removal of tiny amounts of floral resources to get nourishment. Bees that vibrate flowers take only one to few seconds to remove pollen (De Luca et al. 2013) making them effective pollinators that busily move between conspecific plants.

Asynchronous flower opening makes it difficult for resource-seeking effective pollinators to adjust their visits to the period when *E. fulva* offers pollen. When a population is large enough, asynchronous flowering within individuals promotes outcrossing by forcing pollinators to move between plants (Stephenson 1982, Schmitt 1983, Rathcke and Lacey 1985, Ims 1990). The opposite effect occurs when populations are very small and undergo pollen theft like the studied population. In *E. fulva*, this must have also contributed to the extraordinary scarcity of effective pollinators. In *Gongora quinquenerves*, an orchid species with short non-synchronized flowering phases of individuals, reproductive success was shown to be extraordinarily low in a small population, even without thefts (Martini et al. 2003).

Besides direct and indirect negative effects of flower-damaging *Trigona* bees on the fruit set, the overall low pollen amount of the flowers of *E. fulva* might have intensified the reduction of attractiveness of *E. fulva* flowers to pollinators. The flowers of *E. fulva* carry few pollen grains (a mean of 77,262) when compared to other Melastomataceae species (e.g. *Tococa nitens*, 579,100; *Comolia microphylla*, 124,440; *Tibouchina fraterna*, 537,292) (Hokche and Ramirez 2008), expressed in a low pollen/ovule ratio,

and thus might be less attractive to pollen collecting buzz-pollinating bees than the more pollen rich flowers.

Species of Melastomataceae usually produce fruits at much higher rates (35-91.5%) (Fracasso and Sazima 2004; Fracasso 2008; Santos et al. 2010) than what we found in our study. The combination of scarce resources and damaging negative effects may have discouraged visits by effective pollinators, which are those that can buzz pollinate.

Trigona bees are known to damage anthers to collect pollen hidden in poricidal anthers of Melastomataceae, *Cassiinae* and *Solanum* (Renner 1983; Gottsberger and Silberbauer-Gottsberger 1988; Bezerra and Machado 2003). Renner (1983) described in detail the destructive behavior of pollen gathering by workers of *Trigona dallatorreana*, *T. fulviventris*, *T. hyalinata*, *T. spinipes* and *T. williana* to flowers of 34 species of Melastomataceae. The different species of *Trigona* show similar behavior, and our study corroborates that of Renner (1983). Besides the cuts in anthers cited in the works above, workers of *T. fulviventris* also cut the styles in the studied *E. fulva* population, intensifying the negative effect on fruit set. In contrast to the studies that show species of *Trigona* as floral visitors that cause a negative impact on the reproductive success, there are some cases in which they may be effective pollinators (Slaa et al. 2006; Silberbauer-Gottsberger 2013; Pinto and Schlindwein 2014, Giannini et al. 2014) or secondary pollinators (Stein and Hensen 2011). Recently, the label *rescue pollinator* was proposed for the very common *T. spinipes* due to its capacity to colonize degraded habitats and its persistence in heavily-altered landscapes (Jaffé et al. 2016). However, because of the numerous reports on the negative impacts on pollination and fruit set, which bees of *Trigona* cause in many plant species they visit, the term appears to be misapplied.

Self-compatibility does not save *E. fulva*

Failure of pollination due to lack of effective pollinators or scarcity of floral visitors, for example in regions with adverse climatic conditions, may be compensated by self-pollination in self-compatible species (Wilcock and Neiland 2002; Vaughton and Ramsey 2010; Rodger et al. 2013). This is not the case for the self-compatible *E. fulva* because the pollen grains, hidden inside the poricidal anthers, do not reach the stigma without the mediation of bees that vibrate the flowers.

Eriocnema fulva is a threatened species, with only four small known populations in a region with constant pressure of opencast mining activities (Jacobi and Carmo 2008, Jacobi et al. 2011). The studied population was chosen because of the highest density of individuals and easy access. The other three populations had signs of flower damages and in one of them Andrade et al. (2007) also observed the destruction of stamens by *Trigona* sp.

We therefore conclude that direct and indirect negative impacts of damage to anthers and styles inflicted by *Trigona fulviventris* negatively affect the reproductive success of *Eriocnema fulva* and put its survival at risk. The conservation of this threatened species, regarding its *in situ* reproduction, requires measures against general habitat loss that will benefit both abundance of this plant species and of its effective pollinators. *Ex situ* conservation measures should also be implemented, such as keeping specimens in botanical collections to enable its reproduction and reintroduction. Measures against the flower-damaging native stingless bees, however, are by no means tolerable due to the innumerable biological interactions that these bees show with the native flora and fauna.

Acknowledgments

We thank Carlos Alberto Ferreira Junior for his help during field work, and José Neiva, Alberto Teixeira and Paula Calaça for their help with the statistical analyses and discussion and the two anonymous reviewers and David Inouye for their comments, which improved the manuscript. The Fundação Zoo-Botânica provided logistic support. The support of the graduate course in Ecology, Conservation and Management of Wildlife (ECMVS), Universidade Federal de Minas Gerais, is duly acknowledged. This research received financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Processo APQ-01707-14. We also thank for the individual research fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PNPD-CAPES) to RO, and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) to CMJ and CS.

Authors contribution

JOR and CS conceived this research and designed experiments; RO and CMJ participated in the design and interpretation of the data; JOR performed the experiments; JOR and CS wrote the paper. All authors performed analysis, participated in the revisions, read and approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no potential conflict of interest in relation to the study in this paper.

References

- Agresti, A. (2007) Logistic Regression, in: An introduction to categorical data analysis, Second Edition, John Wiley, Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. DOI: 10.1002/9780470114759.ch4
- Andrade, P.M. (2009) Sistema de reprodução e recomendações para conservação da *Eriocnema fulva* Naudin (Melastomataceae), espécie ameaçada de extinção. *Biota* **2** (1), 4-31
- Andrade, P.M., Forni-Martins, E.R., Martins, F.R. (2007a) Reproductive system of *Eriocnema fulva* Naudin (Melastomataceae), an endemic species of Minas Gerais state, SE Brazil. *Braz.J. Biol.* **67** (2), 313-319
- Andrade, P.M., Santos, F.A.M., Martins, F.R. (2007b) Size structure and fertility in an *Eriocnema fulva* Naudin (Melastomataceae) population in Southeastern Brazil. *Braz. J. Biol.* **67** (4), 685-693
- Ayres, M., Ayres, Jr. M., Ayres, D.L., Santos, A.A. (2007) BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamirauá, Belém-PA
- Baumgratz, J.F.A., Pinheiro, F.M., Santos, L.A.F., Barros, F.S.M., Sfair, J.C., Moraes, M.A., Messina, T. (2013) Melastomataceae, in: Martinelli, G., Moraes, M.A. (Eds.), Livro vermelho da flora do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp. 673-696
- Bezerra, E.L.S., Machado, I.C. (2003) Biologia floral e sistema de polinização de *Solanum stramonifolium* Jacq. (Solanaceae) em remanescente de Mata Atlântica, Pernambuco. *Acta Botanica Brasilica* **17**, 247-257

Buchmann, S.L. (1983) Buzz pollination in angiosperms, in: C.E. Jones, R.J. Little (Eds.), Handbook of experimental pollination biology. Van Nostrand, Reinhold, New York, pp. 73-113

Burkart, A., Schlindwein, C., Lunau, K. (2014) Assessment of pollen reward and pollen availability in *Solanum stramonifolium* and *Solanum paniculatum* for buzz-pollinating carpenter bees. *Plant Biology* **16**, 503-507

Canela, M.B.F., Sazima, M. (2003) Florivory by the crab *Armases angustipes* (Grapsidae) influences humming bird visits to *Aechmea pectinata* (Bromeliaceae). *Biotropica* **35**, 289-294

Dafni, A., Kevan, P.G., Husband, B.C. (2005) Practical Pollination Ecology. Enviroquest, Cambridge, Canada

De Luca, P.A., Vallejo-Marín, M. (2013) What's the "buzz" about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 429-435

De Luca, P. A., L. F. Bussiere, D. Souto-Vilaros, D. Goulson, A. C. Mason and M. Vallejo-Marín. (2013). Variability in bumblebee pollination buzzes affects the quantity of pollen released from flowers. *Oecologia* **172**, 805-816

Drummond, G.M., Martins, C.S., Machado, A.B.M., Sebaio, F.A., Antonini, Y. (2005) Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, 222p

Endress, P. K. (1994) Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press, Cambridge

Evans, M.E.K., Menges, E.C., Gordon, D.R. (2003) Reproductive biology of three sympatric endangered plants endemic to Florida scrub. *Biological Conservation* **111**, 235-246

Ferreira, C.A., Torezan-Silingardi, H.M. (2013) Implications of the floral herbivory on Malpighiaceae plant fitness: Visual aspect of the flower affects the attractiveness to pollinators. *Sociobiology* **60** (3), 323-328

Fracasso, C.M. (2008) *Biologia da Polinização e reprodução de espécies de Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas

Fracasso, C.A., Sazima, M. (2004). Polinização de *Cambessedesia hilariana* (Kunth) D.C. (Melastomataceae): sucesso reprodutivo versus diversidade, comportamento e frequência de visitas de abelhas. *Revista Brasileira de Botânica* **27** (4), 797-804

Giannini, T.C., Boff, S., Cordeiro, G.D., Cartolano, Jr.E.A., Veiga, A.K., Imperatriz-Fonseca, V.L., Saraiva, A.M. (2014) Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie* **46**, 209-223

Giulietti, A.M., Pirani, J.R., Harley, R.M. (1997) Espinhaço range region, in: Davis, S.D., Heywood, V.H., Herrera-MacBride, O., Villa-Lobos, J., Hamilton, A.C. (Eds.), *Centres of Plant Diversity, vol. 3. The Americas*. WWF-IUCN, Washington, 397-404

Goldenberg, R., Shepherd, G.J. (1998) Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in cerrado vegetation. *Plant Systematics and Evolution* **211**, 13-29

Goldenberg, R., Varassin, I.G. (2001) Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, Jundiá, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **24**, 283-288

Gottsberger, G., Silberbauer-Gottsberger, I. (1988) Evolution of flower structure and pollination in Neotropical Cassinae (Caesalpiniaceae) species. *Phyton (Austria)* **28**, 293-320

Harter, B., Leistikow, C., Wilms, W., Truylio, B., Engels, W. (2002) Bees collecting pollen from flowers with poricidal anthers in a south Brazilian Araucaria forest: a community study. *Journal of Apicultural Research* **41**, 9-16

Hokche, O.D., Ramirez, N. (2008) Sistemas reproductivos em especies de Melastomataceae en La Gran Sabana (Estado Bolívar, Venezuela). *Acta Bot. Venezuela* **31**, 387-408

Ims, R. A. (1990) The ecology and evolution of reproductive synchrony. *Trends Ecol. Evol.* **5**, 135-140

Jacobi, C.M., do Carmo, F.F. (2008) The Contribution of Ironstone Outcrops to Plant Diversity in the Iron Quadrangle, a threatened Brazilian landscape. *Ambio (Oslo)* **37**, 324-326

Jacobi, C.M, do Carmo, F.F, Campo, I.C. (2011) Soaring extinction threats to endemic plants in Brazilian metal-rich regions. *Ambio (Oslo)* **40**, 540-543

Jaffé, R., Castilla, A., Pope, N., Imperatriz-Fonseca, V.L., Metzger, J.P., Arias, M.C., Jha, S. (2016) Landscape genetics of a tropical rescue pollinator. *Conserv. Genet.* **17**, 267-278

Kearns, C.A., Inouye, D.W., Waser, N.W. (1998) Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematic* **29**, 83-112

Kruckeberg, A.R., Rabinowitz, D. (1985) Biological aspects of endemism in higher plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **16**, 447-479

Krupnick, G.A., Weis, A.E., Campbell, D.R. (1999) The consequences of floral herbivory for pollinator service to *Isomeris arborea*. *Ecology* **80** (1), 125–134

Martini, P., Schlindwein, C., Montenegro, A. (2003) Pollination, flower longevity and reproductive biology of *Gongora quinquenervis* Ruíz and Pavón (Orchidaceae) in an Atlantic Forest fragment of Pernambuco, Brazil. *Plant Biology* **5**, 495–503

Mesquita-Neto, J.N., Costa, B.P. Schlindwein C. (2017). Heteranthery as a solution to the demands for pollen as food and for pollination – Legitimate flower visitors reject flowers without feeding anthers. *Plant Biology*, DOI:10.1111/plb.12609

Milet-Pinheiro, P., Schlindwein, C. (2009) Pollination in *Jacaranda rugosa* (Bignoniaceae): euglossine pollinators, nectar robbers and low fruit set. *Plant Biology* **11**, 131-141

Ministério do Meio Ambiente (MMA) (2014). Portaria No 443, de 17 de Dezembro de 2014. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>. Acesso em 26/02/2014

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**, 853-858

- Nunes-Silva, P., Hrnčir, M., Imperatriz-Fonseca, V.L. (2010) A polinização por vibração. *Oecologia Australis* **14**, 140-151
- Pinto, C.E., Schlindwein, C. (2014) Pollinator sharing and low pollen-ovule ratio diminish reproductive success in two sympatric species of (Portulacaceae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* **49**, 1-10
- Potts, S., Vulliamy, B., Roberts, S., O'Toole, C., Dafni, A., Ne'eman, G., Willmer, P. (2004) Nectar resource diversity organises flower-visitor community structure. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **113**, 103-107
- Rathcke, B., Lacey E. P. (1985) Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**, 179-214
- Ramos, A.M., Santos, L.A.R., Fortes, L.T.G. (Orgs.) (2009) Normais Climatológicas do Brasil (1961-1990). Instituto Nacional de Meteorologia. Brasília, DF. 465p
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org>
- Renner, S. (1983) The wide spread occurrence of anther destruction by *Trigona* bees in Melastomataceae. *Biotropica* **15**, 251–256
- Renner, S. (1989) A survey of reproductive biology in neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **76**, 496-518
- Rodger, J.G., van Kleunen, M., Johnson, S.D. (2013) Pollinators, mates and Allee effects: the importance of self-pollination for fecundity in an invasive lily. *Functional Ecology* **27**, 1023–1033

- Roulston, T.H., Goodell, K. (2011) The role of resources and risks in regulating wild bee populations. *Annual Review of Entomology* **56**, 293–312
- Santos, A.P.M., Romero, R., Oliveira, P.E.A.M. (2010). Biologia reprodutiva de *Miconia angelana* (Melastomataceae), endêmica da Serra da Canastra, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Botânica* **33**, 333-341
- Santos, A.P.M., Fracasso, C.M., Santos, M.L., Romero, R., Sazima, M., Oliveira, P.E.A.M. (2012) Reproductive biology and species geographical distribution in the Melastomataceae: a survey based on New World taxa. *Annals of Botany* **110**, 667-679
- Sazima, I., Sazima, M. (1989) Mamangavas e irapuás (Hymenoptera, Apoidea): visitas, interações e conseqüências para polinização do maracujá (Passifloraceae). *Revista Brasileira de Entomologia* **33**, 109-118
- Schmitt J. (1983) Density-dependent pollinator foraging, flowering phenology, and temporal pollen dispersal patterns in *Linanthus bicolor*. *Evolution* **37**, 1247–1257.
- Slaa, E.J., Sánchez Chaves, L.A., Malagodi-Braga, K.S., Hofstede, F.E. (2006) Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie* **37**, 293-315
- Schlindwein, C., Westerkamp, C., Carvalho, A.T., Milet-Pinnheiro, P. (2014) Visual signalling of nectar-offering flowers and specific morphological traits favour robust bee pollinators in the mass-flowering tree *Handroanthus impetiginosus* (Bignoniaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **176**, 396-407
- Schlindwein, C., Wittmann, D., Martins, C.F., Hamm, A., Siqueira Filho, J.A., Schiffler, D., Machado, I.C. (2005) Pollination of *Campanula rapunculus* L.

(Campanulaceae): How much pollen flows into pollination and into reproduction of oligolectic pollinators? *Plant Systematics and Evolution* **250**, 147-156

Silberbauer-Gottsberger, I., Vanin, S.A., Gottsberger, G. (2013) Interactions of the Cerrado palms *Butia paraguayensis* and *Syagrus petraea* with parasitic and pollinating insects. *Sociobiology* **60** (3), 306-316

Stein, K., Hensen, I. (2011) Potential pollinators and robbers: a study of the floral visitors of *Heliconia angusta* (Heliconiaceae) and their behaviour. *Journal of Pollination Ecology* **4** (6), 39-47

Stephenson, A. G. 1982. When does outcrossing occur in a mass-flowering plant? *Evolution* **36**, 762-767

Tezuka, T., Maeta Y. (1995) Pollen robbing behaviors observed in two species of introduced stingless bees (Hymenoptera, Apidae). *Japanese Journal of entomology* **63**, 759-762

Vaughton, G., Ramsey, M. (2010) Pollinator-mediated selfing erodes the flexibility of the best-of-both-worlds mating strategy in *Bulbine vagans*. *Functional Ecology* **24**, 374-382

Wilcock, C., Neiland, R. (2002) Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science* **7**, 270-277

Wille-Trejos, A. (1963) Behavioral adaptations of bees for pollen collecting from *Cassia* flowers. *Revista de Biología Tropica* **11** (2), 205-210

Capítulo 2 - Biologia reprodutiva de *Solanum graveolens* Bunbury (Solanaceae), espécie andromonóica, rara e ameaçada de extinção

Resumo

O gênero *Solanum* apresenta uma grande variedade de sistemas sexuais e se caracteriza por possuir anteras poricidas que liberam pólen por vibração de abelhas. Aqui estudamos a biologia reprodutiva e de polinização de uma população de *Solanum graveolens*, espécie ameaçada de extinção que ocorre na Floresta Atlântica, Brasil. O período de floração ocorre entre novembro e janeiro, as flores abrem a partir de 8:00h, fecham ao anoitecer e duram de 6 a 9 dias. A espécie é andromonoica, as plantas possuem flores hermafroditas e estaminadas em diferentes posições da inflorescência, e a função feminina é expressa em flores com estilete longo que cresce gradualmente do quarto ao sexto dia em 73% das flores. Fêmeas de dezessete espécies de abelhas visitaram as flores para coletar pólen, sendo que treze vibraram as anteras (79% das visitas) e quatro não vibraram (21%). Uma flor recebeu em média apenas uma visita de abelha a cada duas horas e 30 minutos. *Solanum graveolens* é uma espécie auto-incompatível, e a maior produção de frutos após polinização cruzada manual (40%) do que em flores acessíveis aos visitantes florais sob condições naturais (12,5%) revela limitação de polinização. O sistema andromonóico apresentado por *S. graveolens* com mais flores hermafroditas, a expressão gradual da função feminina e a assincronia de floração dos indivíduos poderiam funcionar bem se a população fosse maior. Com o número reduzido de flores por planta, uma maior densidade de plantas poderia aumentar a possibilidade de cruzamentos, no entanto, o número de plantas na população é baixo e, resulta em uma baixa taxa de frutificação. Assim, para proteger e conservar esta espécie, estratégias como aumentar o tamanho das populações, promover a conectividade entre

elas e preservar seu habitat, incluindo as abelhas polinizadoras devem ser implementadas.

Palavras-chave: Espécie ameaçada, andromonoiccia, polinização por vibração, Floresta Atlântica, conservação

Abstract

Solanum genus has a wide variety of sexual forms and is characterized by anthers that release pollen by buzz-pollination. Here we study the reproductive and pollination biology of a population of *Solanum graveolens*, an endangered species occurring in the Atlantic Forest, Brazil. The flowering period occurs between November and January, the flowers open from 8:00 p.m., close at dusk and last from 6 to 9 days. The species is andromonoecious, the plants have hermaphrodite and staminate flowers in different positions of the inflorescence, and the female function is expressed in flowers with long style that grows gradually from the fourth to sixth day in 73% of the flowers. Females of seventeen species of bees visited the flowers to collect pollen, thirteen of which vibrated the anthers (79% of visits) and four did not vibrate (21%). One flower received on average only one visit of bee every two hours and 30 minutes. *Solanum graveolens* is a self-incompatible species, and the higher fruit production after manual cross-pollination (40%) than in flowers accessible to floral visitors under natural conditions (12.5%) reveals a limitation of pollination. The andromonoecious system presented by *S. graveolens* with more hermaphrodite flowers, gradual expression of female function, and flowering asynchrony of the individuals could work well if the population were larger. With the reduced number of flowers per plant, a greater density of plants could increase the possibility of crossing, however, the number of plants in the population is low and results in a low fruiting rate. Therefore, to protect and conserve this species,

strategies such as increasing population size, promoting connectivity among them and preserving their habitat, including pollinating bees, should be implemented.

Keywords: Endangered species, andromonoecy, buzz-pollination, Atlantic Forest, conservation

Introdução

A falta de informações fundamentais sobre a biologia reprodutiva e sistema sexual conduz a falhas aos esforços de manutenção e reestabelecimento de espécies raras e ameaçadas de extinção (Anderson et al., 2014). O conhecimento da biologia reprodutiva é importante para a conservação de plantas raras ou com distribuição restrita (Kruckeberg & Rabinowitz, 1985; Kaye, 1999; Evans et al., 2003; Vieira & Grabelos, 2003).

Em sistemas de polinização que envolvem polinizadores especializados, a falta ou baixa abundância desses polinizadores resulta na diminuição da produção de frutos e sementes que pode causar o colapso populacional de determinada espécie de planta ameaçada (Pauw & Bond, 2011; Phillips et al., 2015). A magnitude da redução da taxa de fertilização está relacionada com o grau de dependência do polinizador (Lundgren et al., 2013). Há evidências de que os polinizadores estão em declínio em várias partes do mundo (Biesmeijer et al., 2006; Potts et al., 2010) devido, principalmente, à destruição dos habitats. Estudos sobre plantas em risco de extinção têm mostrado a baixa eficiência ou a ausência de polinizadores efetivos (Kearns et al., 1998; Fernández et al., 2012; Tepedino et al., 2012; Rego et al., 2017).

Falhas na polinização, durante o processo de liberação, transporte ou deposição de pólen no estigma, podem ocorrer por limitação de pólen, polinização ou polinizador (Wilcock

& Neiland, 2002) e plantas raras em habitats fragmentados são particularmente susceptíveis a falhas de polinização (Cunningham, 2000). A avaliação da relação inseto-planta pode apontar se há deficiência na transferência de grãos de pólen para o estigma e na taxa de frutificação da planta e, desta maneira, contribuir para o manejo e a conservação de plantas ameaçadas.

Plantas com anteras poricidas são polinizadas por fêmeas de abelhas que coletam pólen através da vibração das anteras, chamado de *buzz-pollination* ou polinização por vibração (Buchmann, 1983). Anteras poricidas conferem proteção ao pólen e diminuem a sua perda, pois escondem os grãos de pólen e os direcionam para um local específico no corpo do polinizador, além de limitar o espectro de visitantes florais a espécies de abelhas capazes de vibrar as anteras para extrair o pólen (Westerkamp, 1996; Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 1988; Cane & Buchmann, 1989; Almeida et al., 2013; Solis-Montero & Vallejo-Marin, 2017). Em geral, essas abelhas são os polinizadores efetivos das plantas com anteras poricidas, como ocorre em espécies de Solanaceae (Buchmann, 1983; Buchmann & Cane, 1989; Bezzera & Machado, 2003; Dupont & Olensen, 2006; Quesada-Aguilar et al., 2008; Anderson et al., 2014; Burkart et al., 2014).

O gênero *Solanum* apresenta uma grande variedade de sistemas sexuais, que inclui hermafroditismo, andromonoicidia e dioicidia (Symon, 1979). Andromonoicidia, sistema sexual em que um mesmo indivíduo produz flores hermafroditas e estaminadas, é raro em angiospermas (Richards, 1997; Miller & Diggle 2003), entretanto, é comum na família Solanaceae (Symon, 1979; Whalen & Costich, 1986; Anderson & Symon, 1989; Miller & Diggle, 2003). Andromonoicidia em *Solanum* é frequente na forma de variabilidade fenotípica, com variação da proporção de tipos de flores produzidas,

apresentando em geral, uma ou poucas flores hermafroditas abaixo de poucas a muitas flores estaminadas na inflorescência (Diggle 1991, 1994; Miller & Diggle 2003). A transição de hermafroditismo para andromonoiccia envolve a perda da função feminina em flores hermafroditas distais da inflorescência através da produção de um pistilo com um estilete curto e um ovário não funcional (Diggle 1994; Miller & Diggle 2003). Em ambientes onde os fatores bióticos, como a atividade de polinizadores ou frugivoria, e fatores abióticos, como a disponibilidade de recursos que afetam o sucesso da maturação de frutos, são abundantes e previsíveis, a produção de flores estaminadas pode ser vantajosa. No entanto, quando, por exemplo, polinizadores são escassos, a maior produção de flores hermafroditas com potencial de formar frutos será mais vantajosa (Diggle & Miller 2013).

Solanum graveolens Bunbury (Solanaceae) é uma espécie com anteras poricidas, rara e ameaçada de extinção, que ocorre em sob-bosque da Floresta Atlântica. A estratégia reprodutiva e a raridade de *Solanum graveolens* foram investigadas, através da (1) fenologia da floração, (2) biologia floral, (3) sistema reprodutivo, (4) sucesso reprodutivo e (5) relação com polinizadores. Foram avaliadas as etapas que incluem desde a produção de flores até a formação de frutos. Especificamente, consideramos as seguintes questões: (1) quando ocorre a floração e frutificação e qual a quantidade de flores e frutos produzidos? (2) como são as flores e como se distribuem nas inflorescências? (3) quem são os visitantes florais, sua frequência e como coletam o pólen? (4) qual é o seu sistema reprodutivo? (5) quais as relações da biologia reprodutiva e sistema sexual com o seu sucesso reprodutivo?

Material e métodos

Local de Estudo

Os estudos de campo foram desenvolvidos na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Serra do Caraça. A RPPN Serra do Caraça é a segunda maior unidade de conservação na categoria reserva particular do patrimônio natural no Brasil, com 10.187 ha e altitudes entre 750 e 2.072 m. A população de *Solanum graveolens* estudada está localizada a 20°06'9.4"S e 43°29'38.4W, entre de 1000 a 1.250 m de altitude. Esta população contém cerca de 30 indivíduos em uma área de aproximadamente 800 metros quadrados em sub-bosque de Floresta Estacional Semidecídua. O clima é do tipo Cwb de acordo com o sistema de classificação climatológica de Köppen-Geiger, caracterizado por inverno seco e verões chuvosos (Antunes, 1986). As temperaturas médias anuais mínimas e máximas são de 16°C e 21°C, respectivamente, e a precipitação média anual é superior a 1500 mm (Brandão et al., 1994). Esta área de estudo está inserida no Quadrilátero Ferrífero, que foi incluído nas Prioridades para Conservação da Biodiversidade do Estado de Minas Gerais, devido ao alto grau de endemismo de plantas, e às constantes pressões de mineração, expansão urbana e queimadas na região (Drummond et al., 2005).

A espécie em estudo

Solanum graveolens Bunbury (Solanaceae) é uma espécie ameaçada de extinção, classificada como “em perigo” de extinção segundo a lista brasileira de espécies ameaçadas (MMA 2014). Ocorre somente no Brasil, é rara e, apesar dos registros disjuntos que ampliam sua distribuição nos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro, poucas populações são conhecidas. Ocorre em sub-bosques de Florestas Ombrófilas Densas e Estacionais Semidecíduais, em ambientes preservados do Domínio da Floresta Atlântica (Stehmann et al., 2009).

A planta é um arbusto perene, lenhoso apenas na base, com até 1,50 m de altura, com folhas compostas pilosas em ambas as faces. Possui inflorescência escorpióide, cálice esverdeado com cinco sépalas, corola com cinco pétalas lilás e cinco estames com filetes subsésseis e anteras amarelas conadas com cerca de 8-10 mm de comprimento e deiscência por poros apicais. O ovário tem cerca de 2 mm de diâmetro, estilete com 8-11 mm de comprimento e estigma truncado. O fruto é verde rajado de branco, ligeiramente alongado com cerca de 1-1,5 cm de diâmetro x 1,5-2 cm de comprimento. (Fig. 1).



Fig. 1. *Solanum graveolens* na RPPN Serra do Caraça, Minas Gerais, Brasil. (a) Ramo com flores; (b) ramo com flores e frutos.

Fenologia reprodutiva

A fenologia reprodutiva de *Solanum graveolens* foi estudada de Maio de 2013 a Maio de 2014. Para isto, os indivíduos que floresceram (N=13) desta população foram monitorados, durante o período de floração e frutificação, sendo registrados, em cada indivíduo: (1) tempo total de floração (dias), (2) número total de indivíduos floridos, (3) altura dos indivíduos, (4) número médio e total de inflorescências e flores, (5) número médio de flores por inflorescência e indivíduo; (6) número médio de flores abertas por indivíduo e dia, (7) número médio de frutos por inflorescência e indivíduo. O sucesso reprodutivo foi avaliado através do acompanhamento da frutificação natural, a partir de

149 flores em 13 indivíduos durante todo o período de floração (2013/2014). A razão fruto/flor foi calculada.

Espécimes testemunhos foram herborizados e depositados nos Herbários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) e do Jardim Botânico da Fundação Zoo-Botânica (FZB-BH).

Biologia Floral

A biologia e morfologia floral foram estudadas a partir de material fresco e fixado em álcool 70%. Botões florais foram marcados e monitorados para determinar o horário e sincronização da abertura das flores, a longevidade floral e o horário da deiscência das anteras. A expressão sexual nas flores (N=30) foi determinada diferenciando flores estaminadas e hermafroditas pelo comprimento do estilete em relação aos estames durante a antese.

Para calcular a razão pólen/óvulo, o número de grãos de pólen por flor foi quantificado utilizando-se a câmara de Neubauer. Para isto, fixamos 20 botões em pré-antese em álcool 70%. Os estames de cada botão floral foram colocados em tubos Eppendorf com uma solução de 1ml de ácido láctico e glicerina 3:1. Os estames foram macerados e agitados por 2 minutos em um agitador vórtex. Uma alíquota deste volume foi transferida para uma câmara Neubauer e os grãos de pólen foram contados para estimar o número total de pólen por flor (Dafni et al., 2005). Nos mesmos botões contamos os óvulos em estereomicroscópio e calculamos a razão pólen/óvulo.

Visitantes florais

A frequência dos visitantes florais foi determinada em 90 horas de observação no campo, entre 8:00 e 18:00 h. Durante a observação, foram monitoradas de uma a três flores por dia e todos os visitantes foram coletados. Registramos o horário e classificamos o comportamento de coleta de pólen pelas abelhas em (1) abelhas que vibram as anteras e (2) abelhas que não vibraram anteras e coletam pólen aderido à superfície de pétalas e estames. Os visitantes florais foram coletados, preparados, etiquetados e depositados na Coleção Entomológica da UFMG (Centro de Coleções Taxonômicas da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil).

Sistema reprodutivo

Para determinar o sistema reprodutivo, foram realizados testes de polinizações controladas *in situ*. Botões em pré-antese foram isolados em sacos de organza e as flores foram submetidas aos seguintes tratamentos: (1) autopolinização espontânea, nas quais as flores ensacadas (N=22) foram deixadas intactas para verificar se formam frutos sem visitantes florais; (2) autopolinizações manuais, nas quais as flores ensacadas foram polinizadas com pólen da própria flor (N=12), (3) polinização cruzada, nas quais as flores ensacadas foram polinizadas com pólen de flores de outros indivíduos (N=10) e (4) flores não ensacadas foram marcadas para determinar o número de frutos e sementes formados em flores acessíveis aos visitantes florais (controle) (N=24). A retirada do pólen das anteras poricidas foi realizada com o auxílio de um diapasão. Autopolinizações manuais e polinizações cruzadas somente foram feitas em flores hermafroditas. O sucesso reprodutivo foi comparado pela taxa de frutificação nos diferentes tratamentos.

Resultados

As plantas estavam pouco desenvolvidas durante o inverno (Junho-Agosto), iniciaram a produção de novos ramos e crescimento destes a partir de setembro-outubro. Botões florais foram desenvolvidos a partir de novembro e o período de floração ocorreu por cerca de 90 dias, entre novembro e janeiro. A formação de frutos iniciou-se em dezembro, e os frutos permaneceram nas plantas até maio.

Em dezembro, as plantas tiveram em média 100cm de altura (dp=27cm, variação 60-150 cm; N=13); não houve correlação entre altura e número de flores. Destes, oito indivíduos (62%) produziram apenas uma inflorescência, três indivíduos (23%) duas inflorescências e dois indivíduos (15%) três inflorescências.

Ao total, os 13 indivíduos produziram 20 inflorescências com um total de 194 flores. O número de flores por inflorescência foi em média de 9,7 (dp=3,7; variação=3-16; N=20) e cada indivíduo produziu em média 14,9 flores (dp=9,1; variação=3-37; N=13). Cada indivíduo possuiu até 3 flores abertas por dia e o número de flores abertas por dia na população foi em média 7,9 (dp=2,9; variação=3-11; N=10). As inflorescências produziram em média 1,1 (dp=1,5; variação=0-5; N=20) frutos. Cada indivíduo produziu em média 1,8 frutos (dp=2,3; variação=0-7; N=13). A razão fruto/flor foi de 11,8%.

Os frutos tiveram um período de crescimento de 2 a 3 meses. Quando maduros eram esverdeados com rajas brancas e caíram facilmente quando tocados. Os frutos produziram em média 165 sementes (dp=37,8; variação=70-213; N=22).

As flores não possuíam um odor perceptível e abriram progressivamente na inflorescência. As flores abriram em diferentes horários, a partir de 8:00h e fecharam

diariamente ao anoitecer, por volta das 18:00h e duraram de 6 a 9 dias. Dentro de 15 dias perderam pétalas, estames e estiletos. Se não houvesse formação de frutos, as demais peças florais caíam junto com o pedicelo, deixando uma cicatriz no ramo.

As flores eram hermafroditas ou estaminadas. Em flores hermafroditas, nos quatro primeiros dias da antese houve apenas a liberação do pólen, enquanto isso o estilete estava crescendo. A partir do quarto dia, além da liberação de pólen, o estigma estava exposto no meio dos estames. Flores estaminadas mantinham o estilete curto, durante toda a antese, escondido dentro do conjunto de estames. Estas flores eram apenas doadoras de pólen, não expressavam a função feminina, nunca formando frutos. Os indivíduos observados possuíam flores estaminadas e hermafroditas, e os dois tipos estavam em todas as posições da inflorescência, não havendo distinção entre flores apicais e basais (Fig. 2). Os frutos (N=23) também foram produzidos em diferentes posições na inflorescência (Fig. 3).

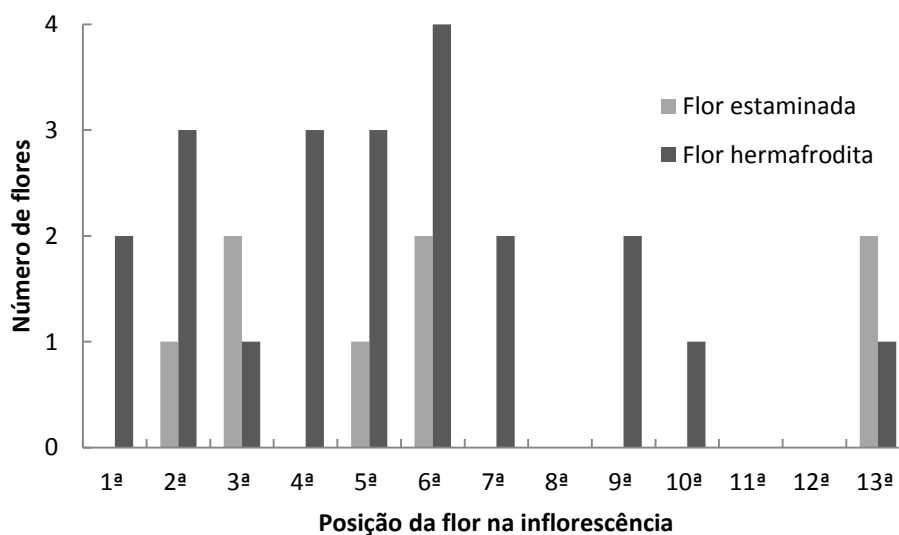


Fig. 2. Posição de flores estaminadas e hermafroditas (N=30) nas inflorescências em *Solanum graveolens* na RPPN Serra do Caraça, Minas Gerais, Brasil. A posição representada está na ordem crescente, da flor mais basal (1ª) até a mais apical (13ª).

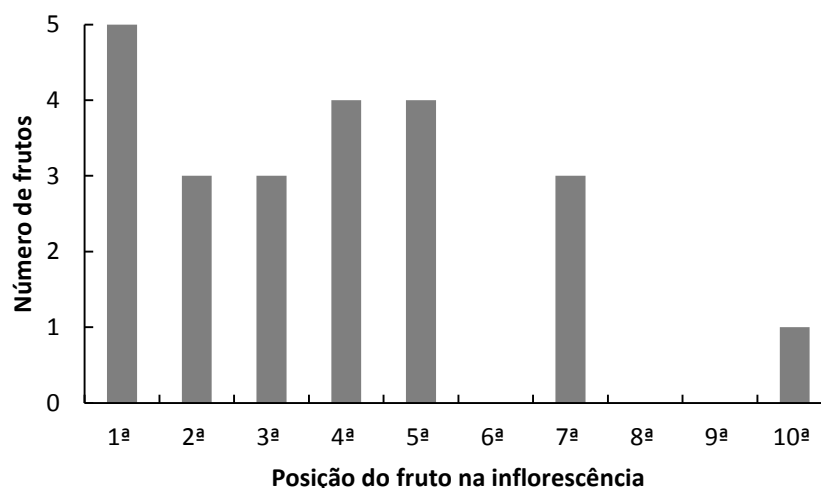


Fig. 3. Posição dos frutos (N=23) nas inflorescências em *Solanum graveolens* na RPPN Serra do Caraça, Minas Gerais, Brasil. A posição está representada na ordem crescente, do fruto mais basal (1ª) até o mais apical (10ª).

A função feminina era expressa em flores com estilete longo a partir do quarto dia, em 50% destas flores (N=22) o estigma tornou aparente no quarto dia, 32% no quinto dia e 18% no sexto dia. Das flores observadas do primeiro dia da antese até o fechamento (N=30), 27% mantiveram o estilete curto, ou seja, a proporção de estilete curto e longo foi cerca de 1:3. O comprimento dos estiletos foi em média de 10,6 mm em flores hermafroditas (dp=1,2; variação=9,1-12,6; N=16) e 8,4 mm em flores estaminadas (dp=0,9; variação=7,2-9,1; N=6)

Uma flor produziu em média 2.759.550 (dp=447.969; N=20) grãos de pólen e em média 133,8 (dp=22,5, N=20) óvulos. A razão pólen/óvulo foi de 20.617:1.

Visitantes florais

Foram registradas exclusivamente abelhas visitando flores de *S. graveolens*, em total de 17 espécies (Tabela 1, Fig. 4). As visitas iniciaram a partir das 9:00 h e terminaram às 17:00 h.

Tabela 1. Visitantes florais de *Solanum graveolens* durante duas estações de floração (2013-2015). A frequência refere-se ao número de visitas totais em 90 horas de observação, e os números entre parênteses são as frequências relativas em porcentagem. V= abelhas que vibram as anteras e NV= abelhas que não vibraram anteras e coletam pólen aderido à superfície de estames e pétalas.

Visitantes Florais	Frequencia (%)	Coleta de pólen
Apidae		
Bombini		
<i>Bombus (Fervidobombus) brasiliensis</i> Lepeletier, 1836	12 (10.3)	V
<i>Bombus (Fervidobombus) atratus</i> Franklin, 1913	2 (1.7)	V
Eucerini		
<i>Thygater analis</i> (Lepeletier, 1841)	4 (3.4)	V
<i>Trichocerapis mirabilis</i> (Smith, 1865)	5 (4.2)	V
Euglossini		
<i>Eufriesea violacea</i> Lepeletier, 1841	2 (1.7)	V
<i>Euglossa melanotricha</i> Moure, 1967	13 (11.1)	V
<i>Euglossa</i> sp.	10 (8.5)	V
Exomalopsini		
<i>Exomalopsis</i> sp.	2 (1.7)	V
Meliponini		
<i>Melipona bicolor</i> Lepeletier, 1836	3 (2.5)	V
<i>Plebeia</i>	6 (5.1)	NV
<i>Trigona fulviventris</i> Guérin 1844	13 (11.1)	NV
Tapinotaspidini		
<i>Paratetrapedia fervida</i> (Smith, 1879)	31 (26.5)	V
<i>NI</i>	3 (2.5)	NV
Halictidae		
Augochlorini		
<i>Augochloropsis</i> sp1	1 (0.8)	V
<i>Augochloropsis</i> sp2	1 (0.8)	V
<i>Augochloropsis</i> sp3	1 (0.8)	V
<i>Pseudaugochlora</i> sp.	8 (6.8)	V

O período de maior visitação foi entre 10:00 e 16:00 h (Fig. 5). As abelhas mais frequentes foram *Paratetrapedia fervida*, *Euglossa melanotricha*, *Trigona fulviventris*, *Bombus brasiliensis*, *Euglossa* sp, *Pseudaugochlora* sp. e *Plebeia* sp. perfazendo 79,5% das visitas.

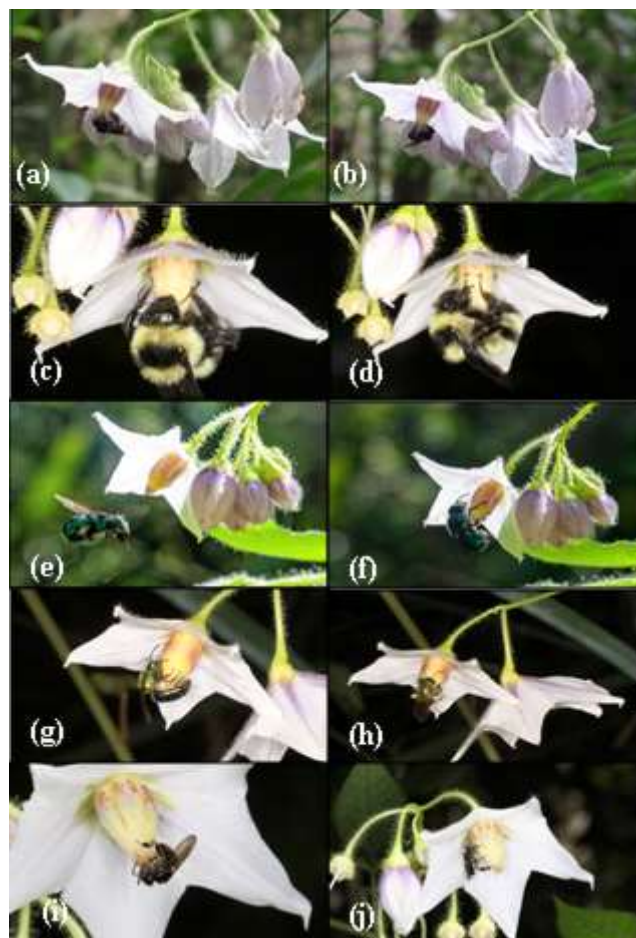


Fig. 4. *Solanum graveolens* na RPPN Serra do Caraça, Minas Gerais, Brasil. (a-j) Visitantes florais. (a-b) *Paratetrapedia fervida*; (c-d) *Bombus brasiliensis*; (e-f) *Euglossa* sp.; (g-h) *Pseudaugochlora* sp.; (i-j) *Trigona fulviventris*.

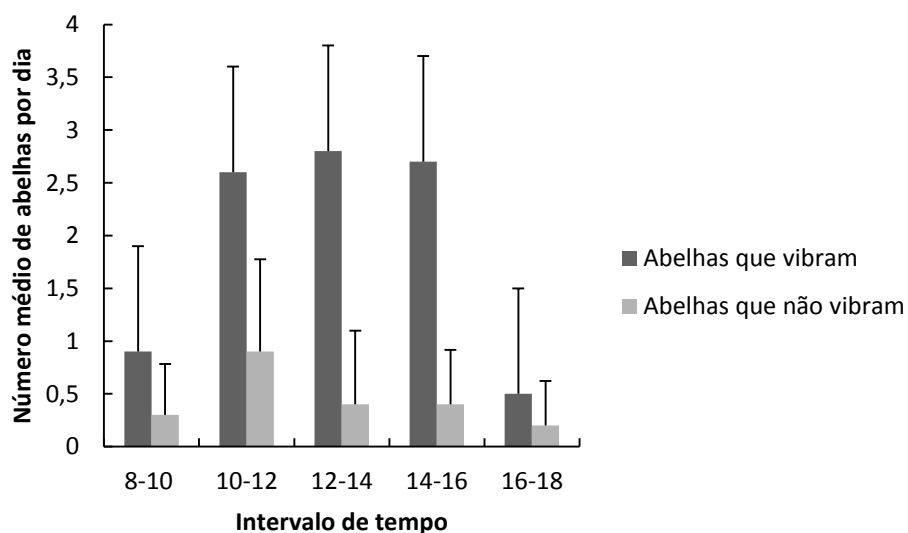


Fig. 5. Número médio de visitas por dia (N=10 dias) de abelhas que vibram (N=13 espécies) e abelhas que não vibram (N=4 espécies) em *Solanum graveolens* em 90 horas de observação.

Uma flor recebeu em média apenas uma visita de abelha a cada duas horas e 30 minutos. Ao longo do dia, uma planta com até 3 flores abertas recebeu, em média, a visita de 5 abelhas (variação de 2-8 abelhas).

As abelhas tiveram diferentes formas de coleta de pólen. Abelhas que vibravam as anteras aproximavam-se da flor frontalmente e pousavam diretamente sobre o cone das anteras, no qual se agarravam com as pernas. Em seguida, recurvavam o abdome sobre a flor, contatando o estigma. Neste momento a abelha realizava movimento vibratório, liberando o pólen, que era depositado nas partes ventrais do tórax e do abdome. Abelhas que não vibravam apresentaram um comportamento diferente, pousavam sobre as anteras tocando o abdome, e com visitas lentas coletavam o pólen residual das anteras e pétalas após a ação das abelhas que vibravam.

Sistema reprodutivo

Solanum graveolens é uma espécie auto-incompatível, não forma frutos por autopolinização espontânea ou autopolinização manual (Tabela 2).

Tabela 2. Tratamentos de polinização de *Solanum graveolens*. O número entre parênteses refere-se ao número relativo de flores e porcentagem de frutificação se considerarmos flores de estilete curto e longo. Letras diferentes na coluna de frutificação indicam diferenças significativas entre tratamentos, com $P < 0.05$ (Mantel Haenszel Chi-square).

Tratamento	Nº de flores	Nº de frutos	Frutificação (%)
Autopolinização espontânea	22	00	0a
Autopolinização manual	12	00	0a
Polinização cruzada manual	10	04	40 (30,7)b
Polinização natural (controle)	24	03	12,5c

Flores após polinização cruzada manual formaram mais frutos que flores polinizadas por abelhas. O sucesso de frutificação das flores oriundas de polinização cruzada manual e polinização natural mostra diferenças significativas, 40% e 12,5% respectivamente.

Discussão

Solanum graveolens apresenta um baixo sucesso reprodutivo, uma baixa densidade de plantas e uma baixa frequência de visitantes florais.

Limitação de polinização

Verificamos uma frequência muito baixa de visitantes em *S. graveolens*, com uma média de apenas cinco visitas por planta durante o dia. A maior produção de frutos após polinização cruzada manual quando comparado com a produção de frutos em flores acessíveis aos visitantes florais sob condições naturais revela limitação de polinização. A polinização insuficiente pode resultar da quantidade insuficiente de pólen depositada no estigma por visitantes escassos e/ou ineficazes, ou da qualidade limitada associada à compatibilidade do pólen recebido (Ashman et al., 2004; Aizen & Harder, 2007). Limitação de pólen é comum em angiospermas, entre 62-73% de plantas polinizadas por insetos mostram evidências de recepção inadequada de pólen (Ashman et al., 2004) que resultam em baixa produção de frutos e sementes (Johnston, 1991; Knight et al., 2005; Gómez et al., 2010).

Frutificação em condições naturais

As consequências de limitação de pólen pela falta de polinizadores são alarmantes para uma planta rara, endêmica e com populações pequenas como *Solanum graveolens*, pois resultam em uma baixa produção de frutos que é fundamental para a persistência da espécie. Baixa produção de frutos ou sementes por limitação de pólen é comum em populações pequenas e isoladas (Aizen & Feinsinger 1994, Agren 1996), pois possuem uma baixa fertilidade resultante da insuficiente qualidade ou quantidade de pólen. Isto é especialmente grave para a persistência de plantas com distribuição restrita, já que estas geralmente se caracterizam por baixa fertilidade quando comparada com congêneras amplamente distribuídas (Lavergne et al., 2004). Pequenas populações podem enfrentar um aumento do risco de extinção devido à redução da reprodução (Kéry et al., 2000; Matthies et al., 2004). *Solanum graveolens* é associada à Floresta Atlântica, um

ambiente altamente ameaçado, com somente 7,6% de florestas remanescentes (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 1998) e suas populações são pequenas e isoladas.

Andromonoícia

Solanum graveolens é uma espécie andromonóica e apresenta dois morfotipos florais: flores hermafroditas com estilete longo e flores estaminadas com estilete curto, funcionalmente masculinas. Andromonoícia ocorre em aproximadamente 4000 espécies de angiospermas de pelo menos 33 famílias (Yampolsky & Yampolsky, 1922; Miller & Diggle, 2003). Em Solanaceae é bem documentada em *Solanum* (Symon, 1979; Whalen & Costish, 1986; Anderson & Symon, 1989), onde a maioria das espécies andromonóicas está no subgênero *Leptostemonum*, com presença nas 13 das 22 seções descritas (Whalen & Costish, 1986; Anderson & Symon, 1989). Neste subgênero, a seção *Acanthophora* apresenta uma predominância de flores hermafroditas (Diggle e Miller 2013) enquanto na seção *Lasiocarpa* há uma grande variação do número de flores hermafroditas ou estaminadas (Whalen et al., 1981), com algumas espécies com poucas flores estaminadas (*S. hirtum* Vahl., Diggle, 1993; *S. stramonifolium* Jacq., Whalen et al., 1981; Bezerra & Machado 2003); e outras com muitas flores estaminadas (*S. quitoense* Lam., Whalen & Costich, 1986; *S. vestissimum* Dunal., Whalen et al., 1981). Neste subgênero, mas na seção *Crinitum*, *S. lycocarpum* apresenta a primeira flor na base da inflorescência hermafrodita e as demais estaminadas, contudo há inflorescências com apenas flores estaminadas (Oliveira & Oliveira 1988). *Solanum graveolens* encontra-se no clado *Cyphomandra* e apresenta a maioria das flores hermafroditas, como ocorre na seção *Acanthophora* e em algumas espécies da seção *Lasiocarpa*.

Abundantes flores estaminadas destinam-se a atração de polinizadores e dispersão de pólen enquanto que a presença de poucas flores hermafroditas tende a investir em grandes frutos (Symon 1979; *S. lycocarpum*, Oliveira & Oliveira 1988). Em *Solanum*, há uma tendência de produção de fruto grande quanto menor for o número de flores hermafroditas (Symon, 1979). Em *Solanum lycocarpum* a presença de apenas um grande fruto na inflorescência pode ser devido à concentração do investimento energético e à estratégia de dispersão de sementes. No entanto, a evolução e manutenção de andromonoiccia em *S. carolinensis* são explicadas pelo aumento de pólen produzido por flores estaminadas que prevê uma maior produção de sementes (Vallejo-Marim & Rausher, 2007). Uma vez que flores hermafroditas abrangem aproximadamente três quartos das flores em *S. graveolens*, a andromonoiccia aumenta a possibilidade de produzir mais frutos, que podem ser pequenos e com muitas sementes se houver sucesso na transferência de pólen de flores estaminadas ou hermafroditas.

Se, por um lado, flores de estilete curto não recebem pólen, estas podem ser melhores doadoras de pólen de acordo com as características das abelhas. Em flores andromonóicas de *Solanum carolinense*, os estiletos longos reduzem a remoção de pólen das flores por vibração, pois dificultam que as anteras sejam firmemente agarradas por abelhas grandes como *Bombus impatiens*, mas não interferem na remoção de pólen por pequenas abelhas de Halictidae (Quesada-Aguilar et al., 2008). Como em *S. graveolens* o crescimento do estilete em flores hermafroditas é gradual, inicialmente estas flores são também doadoras de pólen, e os estiletos curtos não interferem na remoção do pólen. Depois, quando a maior parte do pólen já foi removida, estas flores apresentam estilete longo para receber o pólen exógeno das abelhas. Desta maneira, o crescimento tardio do estilete em flores hermafroditas de *S. graveolens* favorece polinização cruzada e a separação das funções femininas e masculinas da flor. Flores

jovens, de estilete curto, são doadoras de pólen, e flores mais velhas, de estilete protuberante, são preferencialmente receptoras de pólen. O crescimento contínuo do estilete durante a antese ocorre em todas as flores de *Solanum luridifuscescens* e pode ser uma estratégia para diminuir a taxa de geitonogamia (Falcão et al., 2016).

A posição das flores de estilete longo e estilete curto na inflorescência ocorre de forma aleatória em *S. graveolens*, diferente de outras espécies de *Solanum*, como *S. lycocarpum* (Oliveira & Oliveira 1988), *S. lidii* (Dupont e Olesen 2006), *S. vespertilio* (Dupont e Olesen 2006, Anderson et al., 2014) e outras dez espécies de *Solanum* (Anderson & Symon, 1989), onde a primeira flor é hermafrodita e as demais são funcionalmente masculinas. A distribuição de flores hermafroditas em mais posições e aleatoriamente nas inflorescências de *S. graveolens* aumenta a possibilidade de formação de frutos, embora nem todas as flores hermafroditas tenham recebido pólen exógeno para formar frutos.

Assincronia de floração e polinização cruzada

A floração assincrônica entre os indivíduos de *S. graveolens*, com poucas flores abertas na inflorescência e em posição aleatória de flores hermafroditas e estaminadas, pode conduzir a uma situação temporal com plantas com flores estaminadas e plantas com flores hermafroditas. Em *S. palinacanthum* as primeiras flores, de uma a três flores, são hermafroditas e as demais são estaminadas e os indivíduos florescem assincronicamente, funcionando como androdioica, com plantas andromonóicas ocorrendo com plantas que carregam apenas flores hermafroditas e plantas com apenas flores estaminadas (Coleman & Coleman 1982). Andromonoicia combinada com a separação temporal de flores estaminadas e hermafroditas podem promover a

polinização cruzada em *S. graveolens* aumentando a possibilidade de formação de frutos.

Incompatibilidade e baixa densidade de plantas e flores

Para formar frutos, a auto-incompatível *Solanum graveolens* depende de abelhas fiéis que voam entre flores de plantas coespecíficas para assegurar deposição de pólen xenogâmico nos estigmas, como ocorre em *S. lycocarpum* (Oliveira & Oliveira, 1988). Apesar do longo período de floração, *S. graveolens* apresenta uma baixa densidade de plantas e de flores. Um maior número de flores abertas aumenta a atratividade e visitação de flores (Mitchell et al., 2004; Nattero et al., 2011). *Solanum graveolens* apresenta poucas flores abertas por inflorescência e por planta, e parte destas flores são estaminadas, características que somadas à raridade da espécie com pequena população resultam em baixa taxa de frutificação. A produção de frutos em flores polinizadas naturalmente em *S. graveolens* é menor do que quando manualmente polinizadas, indicando baixa atratividade e visitação devido a poucas flores abertas na população.

O sistema andromonóico apresentado por *S. graveolens* com mais flores hermafroditas e assincronia de floração poderia funcionar bem se a população fosse maior. O número reduzido de flores por planta e uma maior densidade de plantas poderia aumentar a possibilidade de cruzamentos, no entanto o número de plantas na população é reduzido em *S. graveolens*. Com poucas e pequenas populações, esta espécie é endêmica de um *hotspot* que ainda sofre muitas pressões antrópicas. Espécies endêmicas auto-incompatíveis dos *hotspots* de biodiversidade estão em maior risco de falha de polinização, sugerindo este grupo de espécies como uma prioridade máxima para o desenvolvimento futuro de estratégias de conservação (Alonso et al., 2010).

A andromonoicéia em pequena população, como ocorre em *S. graveolens*, causa uma baixa taxa de frutificação. Assim, para proteger e conservar esta espécie, estratégias como aumentar o tamanho das populações, promover a conectividade entre elas e preservar seu habitat, incluindo as abelhas polinizadoras devem ser implementadas.

Referências

Agren, J., 1996. Population size, pollinator limitation and seed set in the self-compatible herb *Lythrum salicaria*. *Ecology* 77, 1779-1790.

Aizen, M.A., Feinsinger, P., 1994. Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a Chaco dry forest, Argentina. *Ecology* 75, 330-351.

Aizen, M.A., Harder, L.D., 2007. Expanding the limits of the pollen-limitation concept: Effects of pollen quantity and quality. *Ecology* 88, 271-281.

Almeida, N.M., Castro, C.C., Novo, R.R., Leite, A.V., Machado, I.C., 2013. Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly? *Annals of Botany* 112, 1117-1123.

Alonso, C., Vamosi, J.C., Knight, T.M., Steets, J.A., Ashman, T.L., 2010. Is reproduction of endemic plant species particularly pollen limited in biodiversity hotspots? *Oikos* 119, 1192-1200.

Anderson, G.J., Bernadello, G., Santos-Guerra, A., 2014. Reproductive biology of *Solanum vespertilio* (Solanaceae), a zygomorphic, heterantherous, enantiostylous, and andromonoecious rare Canary Islands endemic. *Plant Systematics and Evolution*. DOI 10.1007/s00606-014-1143-4.

- Anderson, G.J., Symon, D.E., 1989. Functional dioecy and andromonoecy in *Solanum*. *Evolution* 43, 204-219.
- Antunes, F. Z., 1986. Caracterização Climática do Estado de Minas Gerais. *Informativo Agropecuário*, 12, 9-13.
- Ashman, T.L., Knight, T.M., Steets, J.A., et al., 2004. Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology* 85, 2408-2421.
- Bezerra, E.L.S., Machado, I.C., 2003. Biologia floral e sistema de polinização de *Solanum stramonifolium* Jacq. (Solanaceae) em remanescente de Mata Atlântica, Pernambuco. *Acta Botanica Brasilica*, Brasília 17(2), 247-257.
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, 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.
- Brandão, M., Gavilanes, M.L., Araújo, M.G., 1994. Aspectos físicos e botânicos de campos rupestres do estado de Minas Gerais. *Daphne* 4(1), 17-38.
- Buchmann, S.L., 1983. Buzz pollination in Angiosperms. Pp. 73-113. In: C.E. Jones & R.J. Little (Eds.). *Handbook of experimental pollination biology*. Van Nostrand & Reinhold, New York.
- Buchmann, S.L., Cane, J.H., 1989. Bees assess pollen returns while sonicating *Solanum* flowers. *Oecologia*, 81, 289-294.

Burkart, A., Schlindwein, C., Lunau, K., 2014. Assessment of pollen reward and pollen availability in *Solanum stramonifolium* and *Solanum paniculatum* for buzz-pollinating carpenter bees. *Plant Biology*, 16, 503-507.

Cane, J.H., Buchmann, S.L., 1989. Novel Pollen-Harvesting Behavior by the Bee *Protandrena mexicanorum* (Hymenoptera: Andrenidae). *Journal of Insect Behavior* 2(3), 431-436

Coleman, J.R., Coleman M.A., 1982. Reproductive biology of an andromonoecious *Solanum* (*S. paliacanthum* Dun.). *Biotropica* 14, 69-75.

Cunningham, S.A., 2000. Depressed pollination in habitat fragments causes low fruit set. *Proceedings of Royal Society of London B* 267, 1149-1152.

Dafni, A., Kevan, P.G., Husband, B.C., 2005. *Practical pollination biology* Enviroquest, Cambridge, Ontario, Canada.

Diggle, P.K., 1991. Labile sex expression in andromonoecious *Solanum hirtum*: floral development and sex determination. *American Journal of Botany* 78, 377-393.

Diggle, P.K., 1993. Developmental plasticity, genetic variation and the evolution of andromonoecy. *American Journal of Botany* 80, 967-973.

Diggle, P.K., 1994. The expression of andromonoecy in *Solanum hirtum* (Solanaceae): phenotypic plasticity and ontogenetic contingency. *American Journal of Botany* 81, 1354-1365.

Diggle, P.K., Miller, J.S., 2013. Developmental plasticity, genetic assimilation, and the evolutionary diversification of sexual expression in *Solanum*. *American Journal of Botany* 100, 1050-1060.

Drummond, G.M., Martins, C.S., Machado, A.B.M., Sebaio, F.A., & Antonini, Y., 2005. Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas. 222p.

Dupont, Y.L., Olesen, J.M., 2006. Andromonoecy and buzz pollination in *Solanum* species (Solanaceae) endemic to the Canary Islands. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 63, 63-66

Evans, M.E.K., Menges, E.C., Gordon, D.R., 2003. Reproductive biology of three sympatric endangered plants endemic to Florida scrub. *Biological Conservation* 111, 235-246.

Falcão, B.F., Schlindwein, C., Stehmann, J.R., 2016. Pollen release mechanisms and androecium structure in *Solanum* (Solanaceae): does anther morphology predict pollination strategy? *Flora* 224, 211–217.

Fernández, J.D., Bosch, J., Nieto-Ariza, B., Gomes, J.M., 2012. Pollen limitation in a narrow endemic plant: geographical variation and driving factors. *Oecologia* 170, 421-431.

Fundação S.O.S. Mata Atlântica and Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE, 1998. Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 1990-1995. São Paulo.

- Gómez, J.M., Abdelaziz, M., Lorite, J., Muñoz-Pajares, A.J., Perfectti, F., 2010. Changes in pollinator fauna cause spatial variation in pollen limitation. *Journal of Ecology* 98, 1243-1252.
- Gottsberger, G., Silberbauer-Gottsberger, I., 1988. Evolution of flower structures and pollination in Neotropical Cassiinae (Caesalpinaceae) species. *Phyton (Austria)*, 28, 293-320.
- Johnston, M., 1991. Pollen limitation of female reproduction in *Lobelia cardinalis* and *L. siphiliaca*. *Ecology* 72, 1500-1503
- Kaye, T.N., 1999. From flowering to dispersal: reproductive ecology of an endemic plant, *Astragalus australis* var. *olympicus* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 86, 1248-1256.
- Kearns, C.A., Inouye, D.W., Waser, N.W., 1998. Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 83-112.
- Kéry, M., Matthies, D., Spillmann, H.H., 2000. Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primula veris* and *Gentiana lutea*. *Journal of Ecology* 88, 17-30.
- Knight, T.M., Steets J.A., Vamosi J. C., et al., 2005. Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 36, 467-497.
- Kruckeberg, A.R., Rabinowitz, D., 1985: Biological aspects of endemism in higher plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 16, 447-479.

Lavergne, S., Thompson, J.D., Garnier, E., Debussche, M., 2004. The biology and ecology of endemic and widespread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. *Oikos* 107, 505-518.

Lundgren, R., Lázaro, A., Totland, O., 2013. Experimental pollinator decline affects plant reproduction and is mediated by plant mating system. *Journal of Pollination Ecology*, 11, 46-56.

Matthies, D., Bräuer, I., Maibom, W., Tschardt, T., 2004. Population size and the risk of local extinction: empirical evidence from rare plants. *Oikos* 105, 481–488.

Miller, J.S., Diggle, P.K., 2003. Diversification of andromonoecy in *Solanum* section *Lasiocarpa* (Solanaceae): the roles of phenotypic plasticity and architecture. *American Journal of Botany* 90(5), 707-715.

Ministério do Meio Ambiente (MMA) (2014). Portaria N. 443, de 17 de Dezembro de 2014. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>. Acesso em 26/02/2014.

Mitchell, R.J., Karron, J.D., Holmquist, K.G., Bell, J.M., 2004. The influence of *Mimulus ringens* floral display size on pollinator visitation patterns. *Functional Ecology* 18, 116-124.

Nattero, J., Malerba, R., Medel, R., Cocucci, A., 2011. Factors affecting pollinator movement and plant fitness in a specialized pollination system. *Plant Systematics and Evolution* 296, 77-85.

Oliveira-Filho, A.T., Oliveira, L.C.A., 1988. Biologia floral de uma população de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) em Lavras, MG. *Revista Brasileira de Botânica* 11, 23-32.

Pauw, A., Bond, W.J. 2011. Mutualisms matter: pollination rate limits the distribution of oil-secreting orchids. *Oikos* 120, 1531–1538.

Phillips, R.D., Peakall, R., Retter, B.A., Montgomery, K., Menz, M.H., Davis, B.J., Hayes, C., Brown, G.R., Swarts, N.D., Dixon, K.W., 2015. Pollinator rarity as a threat to a plant with a specialized pollination system. *Botanical Journal of the Linnean Society* 179, 511–525.

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(6), 345-353.

Quesada-Aguilar, A., Kalisz, S., Ashman, T.L., 2008. Flower morphology and pollinator dynamics in *Solanum carolinense* (Solanaceae): implications for the evolution of andromonoecy. *American Journal of Botany*, 95(8), 974-984.

Rego, J.O., Oliveira, R., Jacobi, C.M., Schlindwein, C., 2017. Constant flower damages caused by a common stingless bee puts survival of a threatened buzz-pollinated species at risk. *Apidologie*, DOI 10.1007/s13592-017-0552-0.

Richards, A.J., 1997. *Plant breeding systems*. 2^a Edition. Chapman & Hall, London, UK. 529pp.

Solis-Montero, L., Vallejo-Marin, M. 2017. Does the morphological fit between flowers and pollinators affect pollen deposition? An experimental test in a buzz-pollinated species with anther dimorphism. *Ecology and Evolution* 7(8), 2706-2715.

Stehmann, J.R., Forzza, R.C., Salino, A., Sobral, M., Costa, D.P., Kamino L.H.Y., 2009. *Plantas da Floresta Atlântica*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Symon, D.E., 1979. Sex forms in *Solanum* (Solanaceae) and the role of pollen collecting insects. Pp.385-398. In: Hawkes JG, Lester RN & Skelding AD (Eds.). The biology and taxonomy of the Solanaceae. Academic Press, London.

Tepedino, V.J., Bowlin, W.R., Griswold, T.L., 2012. Pollinators complicate conservation of an endemic plant: *Physaria obcordata* (Cruciferae) in the Piceance Basin, Colorado. *Natural Areas Journal* 32(2), 140–148.

Vallejo-Marín, M., Rausher M.D., 2007. The role of male flowers in andromonoecious species: energetic costs in *Solanum carolinense* L. *Evolution* 61:404–412.

Vieira, M.F., Grabelos, R., 2003. Sistema reprodutivo de *Oxypetalum mexiae* Malme (Asclepiadaceae), espécie endêmica de Viçosa, MG, Brasil, em perigo de extinção. *Acta Botanica Brasilica* 17, 137-145.

Westerkamp, C., 1996. Pollen in bee flower relations: some considerations on melittophily. *Botanica Acta* 109, 325–32.

Whalen, M.D., Costich, D. E., 1986. Andromonoecy in *Solanum*. In W. G. D’Arcy [ed.], *Solanaceae: biology and systematics*, 284–302. Columbia University Press, New York, New York, USA.

Whalen, M.D., Costich, D.E., Heiser, C.B., 1981. Taxonomy of *Solanum* section *Lasiocarpa*. *Gentes Herbarium* 12, 41-129.

Wilcock, C., Neiland, R., 2002. Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science* 7, 270-277.

Capítulo 3 - *Legrandia concinna* (Myrtaceae), espécie em perigo crítico de extinção, como recurso polínico para a relictual *Manuelia postica* (Apidae, Xylocopinae)

Resumo

O conhecimento sobre os requisitos quantitativos de pólen para abelhas solitárias é importante para ações de preservação de espécies de abelhas e de plantas. *Legrandia concinna* é uma espécie rara e endêmica de florestas decíduas do Chile e suas flores são visitadas por *Manuelia postica*, abelha endêmica dos Andes. *Legrandia concinna* floresce em novembro e dezembro, suas flores duram 3 a 4 dias, fornecem grande quantidade de pólen e não produzem néctar. Abelhas de três espécies visitaram as flores: *Manuelia postica* (53%), *Bombus terrestris* (39%) e *Apis mellifera* (8%). A taxa de visitação foi extraordinariamente baixa, com 2,7 visitas por árvore e hora. *Manuelia postica*, única espécie nativa que visitou *L. concinna*, é uma abelha pequena, com baixo potencial de carga polínica. Realiza visitas florais longas, e não voa entre os indivíduos, pois completa sua escopa em poucas flores do mesmo indivíduo, contribuindo pouco para a polinização cruzada. Já *B. terrestris*, em menor frequência que *M. postica*, pode ser considerado o polinizador mais eficiente de *L. concinna*, pois realiza visitas curtas, possui uma maior capacidade de carga polínica e de voo entre indivíduos, e visita numerosas flores, geralmente contatando o estigma. Flores de *L. concinna* são recursos importantes para a reprodução de *M. postica*, que alimentam suas larvas com 82% de pólen desta espécie e para o provisionamento de uma célula de cria utiliza em média 19 flores desta planta. A reintrodução de indivíduos de *L. concinna* seria recomendada para aumentar suas populações e os recursos polínicos para abelhas, uma vez que esta planta é fonte de uma grande quantidade destes recursos. *Manuelia postica* e possivelmente outras abelhas nativas, com mais recurso polínicos e em maior

frequência, poderiam potencializar as chances de polinização, melhorando o *fitness* desta espécie em estado crítico de ameaça.

Palavras-chave: planta ameaçada, polinização, provisão de pólen, abelha solitária, conservação, Chile

Abstract

Knowledge about the quantitative pollen requirements of solitary bees is important for actions to preserve bee and plant species. *Legrandia concinna* is a rare and endemic species of deciduous forests of Chile and its flowers are visited by *Manuelia postica*, a bee endemic to the Andes. *Legrandia concinna* blooms in November and December, its flowers last 3 to 4 days, supply large amounts of pollen and produce no nectar. Bees of three species visited the flowers: *Manuelia postica* (53%), *Bombus terrestris* (39%) and *Apis mellifera* (8%). The visitation rate was extraordinarily low with 2.7 visits per tree and hour. *Manuelia postica*, the only native species that visited *L. concinna*, are small bees with low potential for pollen loading. They perform long flower visits, do not fly among individuals because they complete their scopa in few flowers of the same individual, contributing little for cross-pollination. *Bombus terrestris*, less frequent than *M. postica*, can be considered the most efficient pollinator of *L. concinna* because it carries out short visits, has a greater capacity of pollen load and of flight between individuals, and visits numerous flowers, usually contacting the stigma. *L. concinna* flowers are important resources for the reproduction of *M. postica*, which feed their larvae with 82% of pollen of this species and for the provision of a breeding cell uses an average of 19 flowers of this plant. The reintroduction of *L. concinna* individuals would be recommended to increase their populations and the pollen resources for bees, since this plant is the source of a large amount of these resources. *Manuelia postica* and

possibly other native bees, with more pollen resources and frequency, could potentiate the chances of pollination, improving the fitness of this critically threatened species.

Keywords: Threatened plant, pollination, pollen provisions, solitary bee, conservation, Chile

Introdução

Pólen é o principal alimento da cria das abelhas. A perda de pólen das plantas para as abelhas beneficia a polinização por alimentar futuros polinizadores (Schlindwein et al. 2005). O conhecimento sobre os requisitos quantitativos de pólen para abelhas solitárias é importante para ações de preservação de espécies de abelhas e de plantas. Alguns estudos abordam a quantidade necessária de pólen para alimentar uma larva de abelha (Minckley et al. 1994, Schlindwein & Martins 2000; Schlindwein et al. 2005, Müller et al. 2006, Larsson & Franzen 2007, Schlindwein et al. 2009). O declínio recente de muitas espécies de abelhas pode ser causado por escassez de alimento provocado pela diminuição na diversidade e quantidade de flores (Müller et al. 2006). Há evidências de que os polinizadores estão em declínio em várias partes do mundo (Biesmeijer et al. 2006, Potts et al. 2010) devido, principalmente, à destruição dos habitats. A perda de plantas fonte de pólen revela ser o fator chave que impulsiona o declínio das abelhas, e estratégias de mitigação deste declínio só serão efetivas se forem direcionadas a conservação destas plantas (Scheper et al. 2014).

A atração de polinizadores florais em uma população com poucos indivíduos de plantas pode ser ineficiente, dificultando a transferência de pólen, e como consequência a produção de frutos. Plantas raras em habitats fragmentados são particularmente susceptíveis a falhas de polinização (Cunningham 2000). Estudos sobre plantas em risco

de extinção têm mostrado baixa eficiência ou ausência de polinizadores efetivos (Kearns et al. 1998, Fernández et al. 2012, Tepedino et al. 2012, Rego et al. 2017). A avaliação da relação inseto-planta pode apontar se há deficiência na transferência de grãos de pólen para o estigma e na taxa de frutificação da planta e contribuir para o manejo e a conservação de plantas ameaçadas.

Legrandia concinna (Phil.) Kausel (Myrtaceae) é uma espécie rara, ameaçada de extinção e endêmica de florestas decíduas do Chile. Como muitas Mirtáceas, possui floração maciça, e as suas flores com muitas anteras são fonte de pólen para as abelhas. Populações de *L. concinna* atualmente ocorrem em fragmentos florestais pequenos e isolados (Altamirano et al. 2007). A variabilidade genética nas populações de *L. concinna* é baixa, com significativa endogamia intra-populacional e um fluxo gênico restrito entre populações fragmentadas (Araneda et al. 2011). Não há estudos sobre a biologia floral, polinização e sistema reprodutivo da espécie.

Registramos visitas de *Manuelia postica* (Spinola, 1851) (Apidae, Xylocopinae) nas flores de *Legrandia concinna*. Manuelliini contém apenas um gênero, *Manuelia*, e três espécies, *M. gayi*, *M. gayatina* e *M. postica* (Engel 2012). *Manuelia* é endêmica dos Andes, ocorre na região central do Chile e parte adjacente da Argentina (Daly et al. 1987). O gênero é considerado relictual (Daly et al. 1987) e constitui um grupo monofilético que tem sido proposto como o táxon basal de Xylocopinae (Sakagami and Michener 1987, Flores-Prado et al. 2010).

Estudamos a relação entre *L. concinna* e *M. postica* e fizemos as seguintes questões: (1) qual a contribuição dessa planta na alimentação da cria de *M. postica*? e (2) qual o papel desta abelha para polinização de *L. concinna*?

Este trabalho investigou (1) a fenologia da floração, (2) biologia floral, (3) sucesso reprodutivo e (4) os polinizadores de *L. concinna*. Com o conhecimento das visitas de *M. postica* e de seus ninhos, determinamos (5) as características das massas de alimento produzidas pelas fêmeas destas abelhas quanto a sua quantidade e composição taxonômica de grãos de pólen e (6) o número de flores *L. concinna* necessário para alimentar uma larva de *M. postica*.

Material e métodos

Área de estudo

O estudo foi conduzido entre novembro de 2016 e janeiro de 2017, em uma população de *L. concinna* localizadas em Radal, Curicó (35°24'43.6"S 71°01'31.1"W), 703m de altitude, Região de Maule, Chile. A região tem clima do tipo mediterrâneo, com precipitação média anual de 1025 mm, concentrada no inverno e temperatura média anual de 14°C, sendo a temperatura média mínima do mês mais frio (julho) de 3,5°C e uma máxima média do mês mais quente (janeiro) de 28,8°C. (Novoa & Villaseca, 1989).

Espécie estudada

Legrandia concinna é monoespecífica do gênero, ocorre em uma faixa estreita da precordilheira andina na VII Região (Maule) e VIII Região (Bío Bío) desde a província de Talca (35°16'S) até a província de Ñuble (36° 41'S) (Fig. 1), entre 400 e 1000 m de altitude (Landrum 1986, 1988; Hechenleitner et al. 2005). A espécie foi incluída na categoria de ameaça "em perigo crítico", o qual sugere que a espécie enfrenta um risco alto de extinção devido, principalmente, a sua distribuição restrita e o baixo número de indivíduos nas populações (Hechenleitner et al. 2005).

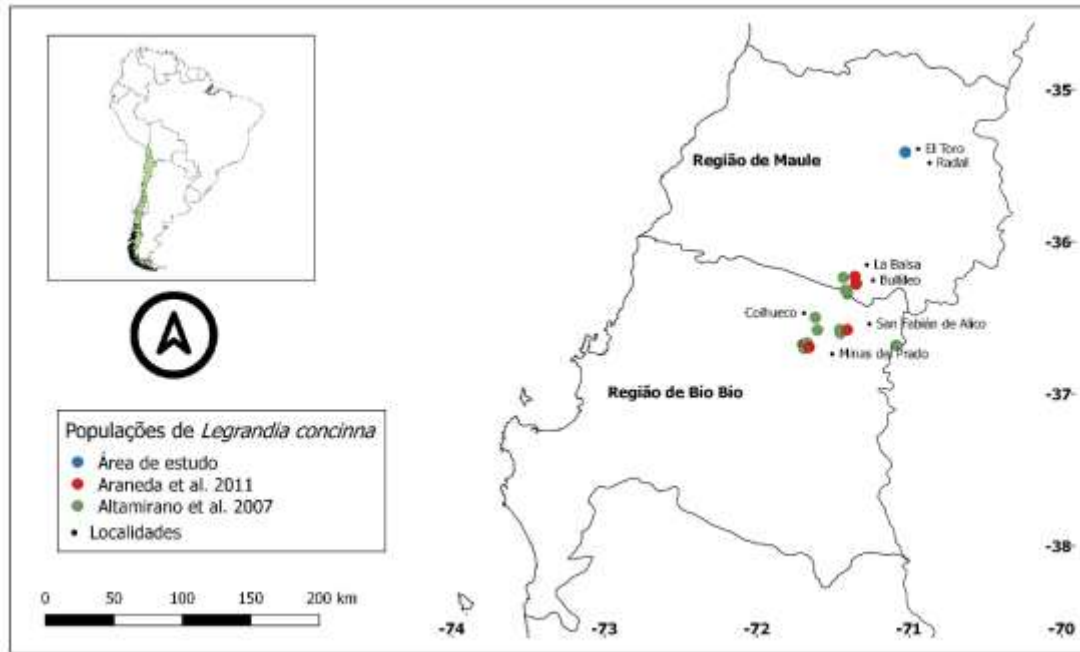


Fig. 1. Mapa da distribuição de *Legrandia concinna* nas Regiões de Maule e Bío Bío, Chile.

A árvore (nome vulgar “luma do norte” ou “luma branca”) tem uma altura de até 8 m e cresce em locais úmidos em florestas de roble (*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst e *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser, Nothofagaceae) associada com espécies características de floresta temperada decídua, como *Gevuina avellana* Molina (Proteaceae), *Laurelia sempervirens* (Ruiz et Pav.) Tul. (Atherospermataceae) e *Luma apiculata* (DC.) (Myrtaceae).

A planta tem flores solitárias, hermafroditas, com quatro pétalas brancas e numerosos estames. A espécie está inserida no “Grupo Pimenta” da tribo Myrtae que compreende o clado *Amomyrtus* e *Legrandia* e o clado de *Campomanesia*, *Psidium*, *Acca* e *Pimenta*, todos os quais aparecem monofiléticos (Lucas et al. 2007).

Biologia Floral

Em 20 indivíduos marcados estimamos a altura da planta e medimos o DAP (diâmetro à altura do peito a 1,30 m acima do nível do solo) do tronco com uma fita métrica. Acompanhamos o número de botões florais, flores abertas, e frutos formados por indivíduo entre novembro de 2016 e janeiro de 2017 durante o período de floração e frutificação. Acompanhamos a frutificação natural para avaliar o sucesso reprodutivo (razão fruto/flor).

Para determinar o horário da abertura da flor, deiscência das anteras, produção de néctar e duração da antese, acompanhamos vinte flores individualmente marcadas em 12 plantas.

Quantificamos o número de grãos de pólen por flor utilizando-se uma câmara de Neubauer. Para isto, fixamos 10 botões em pré-antese de indivíduos diferentes em etanol 70%. Colocamos os estames de cada botão floral em tubos Eppendorf com uma solução de 1ml de ácido láctico e glicerina 3:1, maceramos os estames com um bastão de vidro e agitamos a solução por 2 minutos em um agitador vórtex. Transferimos uma alíquota deste volume para a câmara Neubauer e contamos os grãos de pólen para estimar o número total de pólen por flor (Dafni et al. 2005). Nos mesmos botões contamos os óvulos em estereomicroscópio e calculamos a razão pólen/óvulo.

Exsicatas de espécimes testemunhos foram depositadas no Herbário do Museu Nacional de Historia Natural, Santiago, Chile (SGO 167584, SGO 167585, SGO 167586, SGO 167587).

Visitantes florais

Observamos os visitantes florais em oito dias não consecutivos entre 9:00 e 19:00h. Em dois dias observamos as flores também antes do nascer do sol e depois do por do sol, entre 6:00 e 9:00 h e entre 19:00 e 21:00 h. Determinamos a frequência de visitas ao longo do dia em censos de 25 minutos (N=40), em intervalos de 3 horas (às 9, 12, 15 e 18h) em conjuntos de flores durante quatro dias. Estes conjuntos de flores correspondem a uma, duas ou três árvores com 70-600 flores abertas. Optamos por determinar a frequência de visitantes florais em conjuntos de flores devido à baixa abundância de visitantes florais. Para as abelhas das diferentes espécies encontradas determinamos a duração das visitas florais e o número de flores visitadas na mancha.

Os insetos foram coletados com rede entomológica, mortos em frascos, preparados, etiquetados e depositados nas coleções entomológicas da Universidade Católica de Maule, Talca e Universidade Católica de Valparaíso, Chile.

Análise polínica do aprovisionamento larval de *Manuelia postica*

Ninhos de *M. postica* foram procurados em ramos de bambu *Chusquea quila* (Poaceae), espécie frequentemente utilizada para nidificação desta abelha (Flores-Prado et al. 2008) na área de estudo. Ramos de bambu com ninho (N=23) foram levados para laboratório e cortados longitudinalmente, com o cuidado para não misturar o conteúdo das células de cria. As células de cria por ninho foram contadas e seus conteúdos conservados separadamente em tubos Eppendorf. Abelhas em diferentes estágios, de larva a adulta, foram conservados em álcool 70%. O conteúdo do aprovisionamento larval foi armazenado em ácido acético glacial.

Foram selecionadas dez células de cria de diferentes ninhos que contiveram ovo ou larva no início de desenvolvimento com a carga polínica completa, para a análise polínica. Após remoção do ácido acético com uma pipeta, o material de provisão de cada célula foi transferido para um tubo Eppendorf com uma solução de 1ml de ácido láctico e glicerina 3:1, macerado com bastão de vidro e agitado por 2 minutos em um agitador vórtex. Transferimos uma alíquota deste volume para a câmara Neubauer e determinamos os tipos polínicos e sua frequência relativa. A identificação dos tipos polínicos foi auxiliada por observações de espécies em floração presentes na área neste período e pela comparação de lâminas depositadas na Palinoteca da Universidade de Concepción, Chile.

A quantidade de pólen de *L. concinna* em uma célula de cria foi relacionada com a quantidade de pólen por flor dessa espécie para obter informação sobre a demanda polínica de uma larva de abelha de *M. postica*.

Resultados

Biologia Floral

Legrandia concinna floresceu em novembro e dezembro, e os frutos amadureceram em janeiro e fevereiro. A população encontrada teve árvores com altura média de 3,3m (dp=0,6; variação=1,9-4,0; N=20) e diâmetro médio de 14,4cm (dp=6,2; variação=8-35; N=20), dos quais 12 floresceram. Estes produziram um total de 1690 flores e 142 frutos. Os indivíduos produziram em média 140,8 flores (dp=299,8; variação=5-1050; N=12) e 11,8 frutos (dp=26,3; variação=0-72; N=12). A taxa de frutificação média foi de 8,4%, e por indivíduo variou entre 0 a 20,3%. As bagas formadas contiveram em média apenas 0,8 sementes, 62% produziam uma, 9,5% duas e 28,5% não tiveram sementes (N=21).

As flores abriram ao longo do dia com os estames ainda dobrados com o ápice das anteras orientadas para a base da flor (Fig. 2a). As flores permaneceram nesse estágio independentemente do horário de abertura e somente no segundo dia os estames foram desdobrados e as anteras liberaram pólen simultaneamente (Fig. 2b). As flores tiveram uma longevidade de 3 a 4 dias. Depois, pétalas e estames caíram gradativamente (Fig. 2c). As flores não secretaram néctar.



Fig. 2. Flores de *Legrandia concinna* ao longo da antese. (a) Flores recém-abertas com as anteras orientadas para a base da flor (seta); (b) flor no segundo dia de antese com os estames desdobrados; (c) flores senescentes com os estames murchos.

As flores possuíram em média 264,4 estames (dp=76,2; variação=170-361; N=10) e produziram em média 250.700 (dp=156.786; N=10) grãos de pólen e 18,6 (dp=4,8, N=10) óvulos. A razão pólen/óvulo foi 13207:1.

Visitantes florais

Abelhas de três espécies, exclusivamente fêmeas visitaram as flores: *Manuelia postica* 26 visitas (53%), *Bombus terrestris* 19 (39%) e *Apis mellifera* 4 (8%), todas Apidae. Estas abelhas apresentam em média os seguintes comprimento (c) e peso seco (p) do corpo: *Manuelia postica* (c=8,25mm; p=0,01g; N=10), *Bombus terrestris* (c=15,84mm; p=0,06g; N=10) e *Apis mellifera* (c=12,39mm; p=0,04g; N=10). A taxa de visitação foi baixa com 2,7 visitas por árvore/hora.

Todas as abelhas coletaram pólen. As visitas florais de *Manuelia postica* duraram em média 73 s (dp=70; variação=12-189; N=12) e de *Bombus terrestris* 7 s (dp=3,1; variação=3-12; N=12). *Manuelia postica* (Fig. 3) realizava visitas demoradas e ao caminhar entre os estames geralmente tocava o estigma, enquanto *B. terrestris* permanecia menos tempo na flor, porém por ser maior, geralmente tocava o estigma enquanto vibrava o conjunto de anteras próximas ao gineceu. Uma abelha de *M. postica* visitou em média 3,2 flores por árvore (dp=1,1; variação=1-5; N=10) e *B. terrestris* 26,4 flores por árvore (dp=19,8; variação=8-72; N=10). *Apis mellifera* realizava visitas ocasionais e permanecia poucos segundos na flor.



Fig. 3. *Manuelia postica*: (a) Fêmea de *Manuelia postica* visitando uma flor de *Legrandia concinna*, (b) *Manuelia postica* coletada.

Ninhos de *Manuelia postica*

Encontramos 25 ninhos de *M. postica* em ramos mortos ou secos dos entrenós de bambu (*Chusquea quila*), em diferentes alturas. Os ninhos consistiam em um túnel com células dispostas linearmente ao longo da haste da planta, com uma entrada localizada no meio do túnel, uma câmara de entrada e geralmente quatro células de cria separadas por partes bicôncavas de partículas de madeira (Fig. 4).

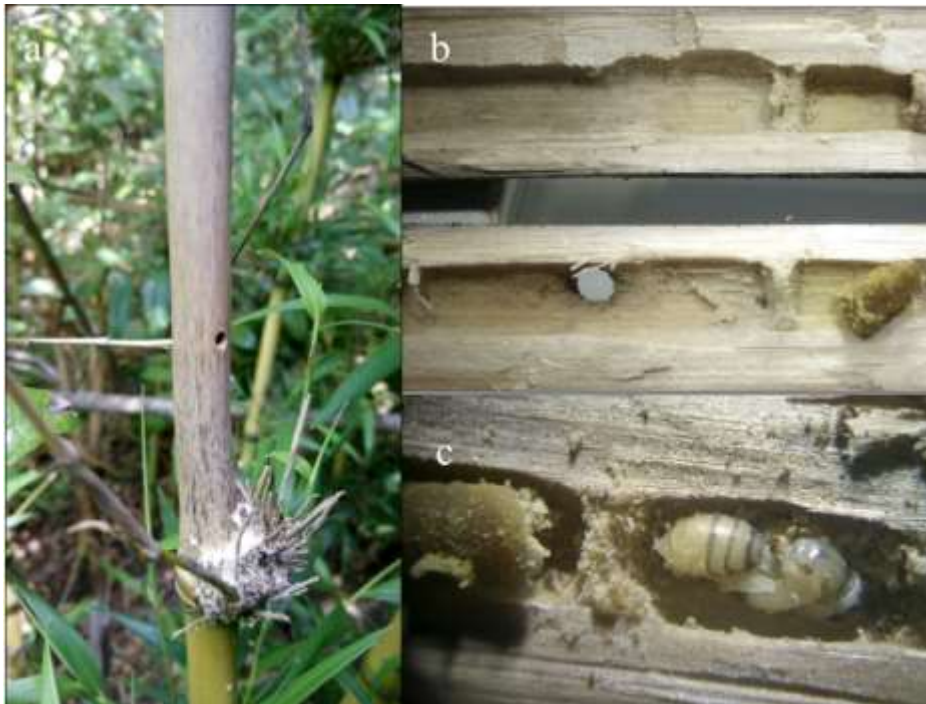


Fig. 4. Ninho de *Manuelia postica* em ramo de bambu (*Chusquea quila*) coletados em Radal, Chile: (a) ramo de bambu com ninho, (b) câmara de entrada do ninho e uma célula com massa polínica, (c) célula com massa polínica e célula adjacente com uma abelha.

A análise polínica de 10 células completas de cria de ninhos diferentes de *Manuelia postica* provisionadas durante a floração de *L. concinna* mostrou a presença de pólen de cinco espécies de planta: *Legrandia concinna* (Myrtaceae), *Lomatia hirsuta* (Proteaceae), *Persea lingue* (Lauraceae), *Aristolelia chilensis* (Elaeocarpaceae) e *Retanilla trinervia* (Rhamnaceae) (Fig. 5).

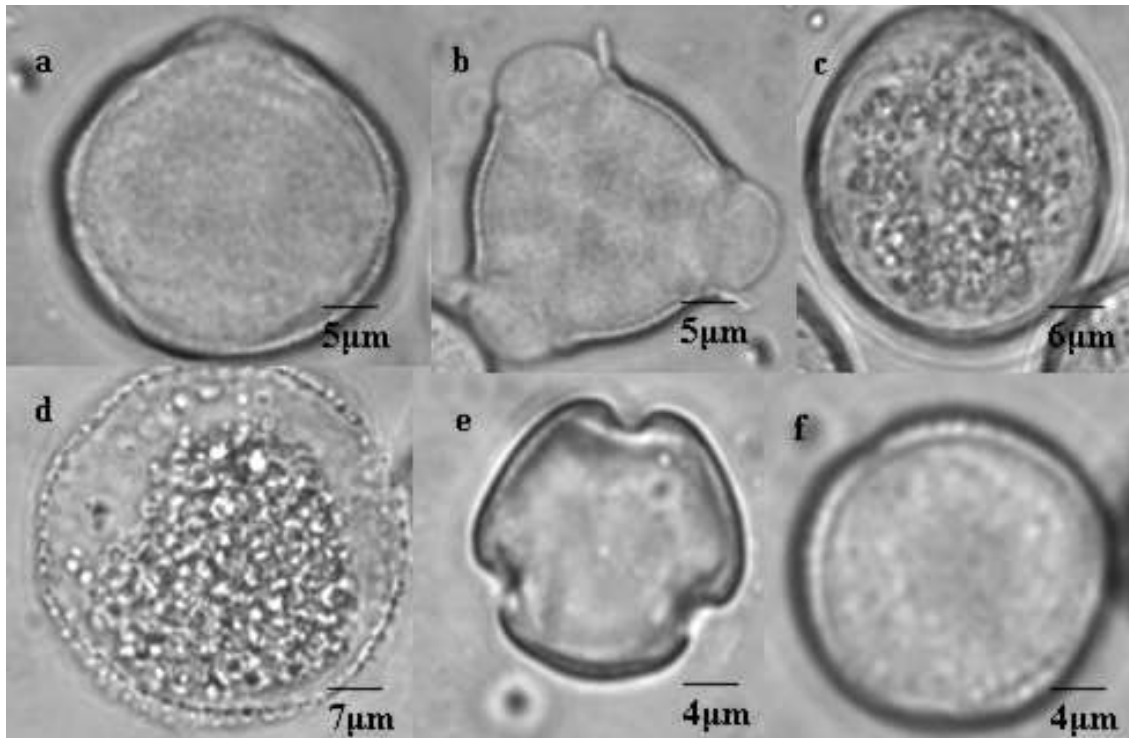


Fig. 5. Tipos polínicos encontrados em ninhos de *Manuelia postica*: (a-b) *Legrandia concinna*, a) vista equatorial, b) vista polar, (c) *Lomatia hirsuta*, (d) *Persea lingue*, (e) *Aristolelia chilensis*, (f) *Retanilla trinervia*. Grãos de pólen frescos.

As células contiveram em média 82,05 % de pólen de *L. concinna* e em sete células de cria o pólen dessa espécie somou mais de 95% de pólen total coletado (Tabela 1, Fig. 6). Todas as células de cria contiveram pólen de *L. concinna* e somente em uma célula houve predominância de pólen de *Lomatia hirsuta*.

Tabela 1. Análise polínica de dez células de cria completas de *Manuelia postica* de ninhos diferentes de Radal, Maule, Chile.

Célula de cria	<i>Legrandia concinna</i>	<i>Lomatia hirsuta</i>	<i>Persea lingue</i>	<i>Aristotelia chilensis</i>	<i>Retanilla trinervia</i>
I	556000 (50,9%)	367000 (33,6%)	151000 (13,8%)	18000 (1,6%)	1000 (0,1%)
II	7807000 (99,8%)	0	0	7000 (0,1%)	11000 (0,1%)
III	2569000 (96,1%)	66000 (2,5%)	39000 (1,4%)	0	0
IV	6612000 (99,8%)	9000 (0,14%)	0	0	3000 (0,05%)
V	3403000 (97,1%)	73000 (2,1%)	27000 (0,7%)	3000 (0,1%)	0
VI	7888000 (96,5%)	257000 (3,1%)	8000 (0,1%)	24000 (0,3%)	0
VII	7944000 (96,4%)	175000 (2,1%)	56000 (0,7%)	68000 (0,8%)	0
VIII	175000 (11,8%)	1229000 (82,5%)	54000 (3,6%)	31000 (2,1%)	0
IX	1730000 (73,8%)	439000 (18,7%)	118000 (5%)	59000 (2,5%)	0
X	8956000 (98,6%)	35000 (0,4%)	3000 (0,03%)	89000 (0,97%)	0

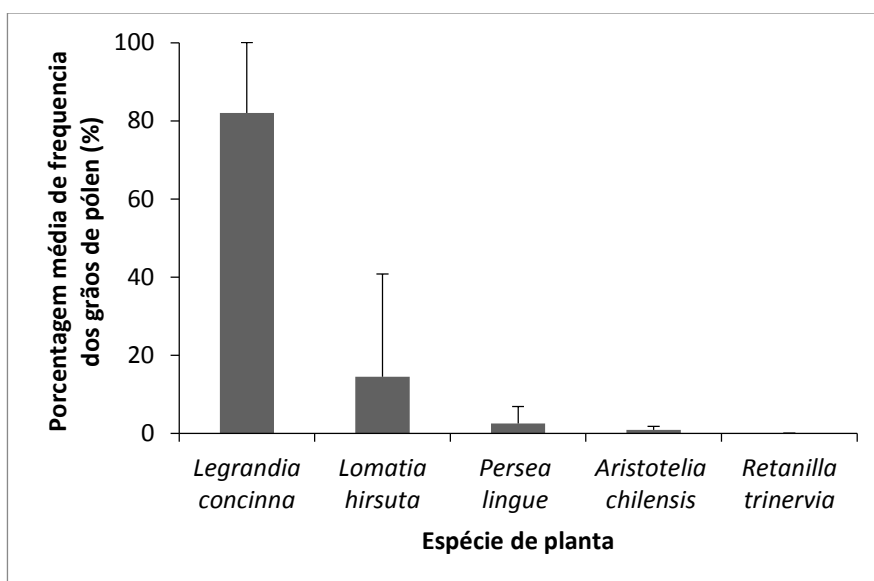


Fig 6. Porcentagem média de frequência dos grãos de pólen na análise do provisionamento de dez (10) células de cria em estágios iniciais de desenvolvimento de ninhos de *Manuelia postica* de Radal, Maule, Chile.

Requerimento de *Legrandia concinna* para provisão larval de *Manuelia postica*

Para o provisão de uma célula de cria, *Manuelia postica* utilizou em média 19 flores de *Legrandia concinna*. Como o total de flores em uma árvore foi, em média, 140,8 (dp=299,8; variação=5-1050; N=12) flores, uma árvore de *L. concinna* é capaz de fornecer pólen para uma média de 7,4 células de cria (variação=0,3-55,3; N=12). A população estudada com 20 árvores (12 apresentaram flores) e um total de 1690 flores forneceu pólen para o provisão de até 88,9 células de cria de *M. postica*.

Discussão

Legrandia concinna*, principal recurso para a polilética *Manuelia postica

Legrandia concinna é um importante recurso polínico para *Manuelia postica*. Na área de estudo, o pólen desta espécie é o principal recurso para alimentar as células de cria de *M. postica*. *Manuelia postica* é uma espécie univoltina, possui estratégias de construção e provisão de alimento típico de abelhas solitárias, e o período de formação da massa de alimento dos ninhos ocorre entre novembro e janeiro (Flores-Prado et al. 2008), no mesmo período de floração de *L. concinna*.

A análise qualitativa e quantitativa de pólen da dieta larval de *M. postica* mostrou que fêmeas alimentam suas larvas com 82% de pólen de *L. concinna* e com outros quatro tipos polínicos em menor proporção, indicando que *M. postica* é uma espécie polilética. Flores-Prado (2012) em Altos de Vilches, Maule, Chile, também demonstrou que *M. postica* é polilética, no entanto na sua análise polínica identificou oito espécies vegetais, com predominância de *Buddleja globosa* (Buddlejaceae, 72.3%) e *Aristolelia chilensis*

(Elaeocarpaceae, 17.7%). Pólen de *A. chilensis* também ocorreu nos ninhos do presente trabalho, porém com uma frequência de 0,85%. A presença de pólen de várias espécies de plantas em células de cria ocorre em outras Xylocopinae, como em *Xylocopa* (Burgett et al. 2005, Hongjamrassilp & Warrit 2014, Lucia et al. 2017) e *Ceratina* (Hussain et al. 2016).

A análise quantitativa das células de cria completas mostrou que a quantidade total de pólen de aproximadamente 19 flores de *L. concinna* são necessárias para alimentar uma larva de *M. postica*. Considerando que flores de *L. concinna* possuem muitas anteras e grande quantidade de pólen, este número de flores corresponde às necessidades de outras abelhas solitárias. A quantidade de flores necessária para alimentar uma larva pode variar dependendo do tamanho da abelha e da quantidade de pólen fornecido pela planta. Assim, mais de 30 flores são necessárias para alimentar uma larva em 85% das 41 espécies de abelhas solitárias analisadas por Müller et al. (2006), enquanto que para alimentar uma larva de abelhas oligoléticas *Ptilothrix plumata* (Apidae, Emphorini) são necessárias de 40 a 50 flores completas de Malvaceae (Schlindwein et al. 2009).

Manuelia postica* e frutificação de *Legrandia concinna

Manuelia postica, única espécie nativa que visitou *L. concinna*, é uma abelha pequena, com baixo potencial de carga polínica. Realiza visitas florais longas, não voam entre os indivíduos, pois completam sua escopa em poucas flores do mesmo indivíduo e ao visitar poucas flores contribui pouco para a polinização cruzada.

Abelhas podem ter vantagens unilaterais, não contribuindo para a polinização cruzada, como ocorre com a oligolética *Perdita texana* (Andrenidae) que enche a escopa em uma única flor de *Opuntia* (Barrows et al. 1976) que, semelhantemente à flor de *L. concinna*, oferece uma grande quantidade de pólen.

O tamanho da abelha pode determinar se a visita será efetiva para a polinização ou se beneficiará apenas a abelha, pois abelhas pequenas quando visitam flores grandes podem contribuir pouco na deposição de pólen no estigma e fertilização da planta. Em geral, visitantes de tamanhos grandes e médios são mais eficientes polinizadores que os pequenos por contatar o estigma com maior probabilidade (Duncan et al. 2004, Solís-Montero et al. 2015, Solís-Montero & Vallejo-Marín 2017, Quinalha et al. 2017) e esta característica de abelhas pequenas pode apresentar um risco na persistência de uma planta rara e endêmica (Vivarelli et al. 2011). Abelhas maiores, com maior capacidade de carga polínica e voos a longa distância seriam mais eletivos para o sucesso reprodutivo de *L. concinna*.

***Legrandia concinna* e *Bombus terrestris*, uma espécie introduzida**

Bombus terrestris, em menor frequência que *M. postica*, realiza visitas curtas, possui uma maior capacidade de carga polínica e de voo entre indivíduos, e visita numerosas flores, geralmente contatando o estigma. Nestas condições, *Bombus terrestris* é o polinizador mais eficiente de *L. concinna*. A eficiência na polinização por *Bombus terrestris* fez com que esta espécie fosse introduzida em várias partes do mundo, inclusive no Chile, para aumentar a produção agrícola. Abelhas introduzidas, em manejo com abelhas nativas sem substituí-las, suplementam a polinização e podem aumentar a produção agrícola (Garibaldi et al. 2014). *Bombus terrestris* é um polinizador eficiente pela capacidade de voo a longas distâncias (Wolf & Moritz 2008), e isto seria extremamente importante para conectar as populações fragmentadas de *L. concinna*.

Se por um lado a espécie introduzida *B. terrestris* contribui para a transferência de pólen de *L. concinna*, esta abelha poderia estar deslocando recursos de abelhas nativas. Nos

últimos tempos a espécie nativa *Bombus dahlbomii* tem diminuído suas populações em regiões do Chile onde *B. terrestris* é mais abundante (Ruz & Herrera 2001, Ruz & Vivallo 2005), embora não se saiba se há um deslocamento de uma espécie pela outra. *Bombus terrestris*, ao substituir a abelha nativa, pode causar o rompimento da polinização efetiva em algumas plantas (Goulson 2003, Kenta et al. 2007, Traveset & Richardson 2006, Morales 2007, Madjidian et al. 2008, Morales et al. 2013, Aizen et al. 2014) e a extinção local de espécies de *Bombus* nativos por competição por locais de nidificação (Inoue et al. 2008) e por contaminação por parasitas (Schmid-Hempel et al. 2014). *Bombus terrestris* é pouco eficiente na polinização de *Mimulus luteus* (Phrymaceae) e não causa impacto a *B. dahlbomii* em uma área em fase inicial de invasão desta espécie exótica no Chile (Esterio et al. 2013). *Bombus dahlbomii*, espécie chilena ameaçada de extinção, foi avistada por apenas uma vez durante o estudo, porém não se aproximou da flor de *L. concinna*.

Poucos visitantes e sucesso reprodutivo

A baixa frequência e diversidade de visitantes florais causa uma baixa taxa de frutificação de *L. concinna*. Entre os visitantes florais, está uma única abelha nativa com pouca eficiência na polinização, com baixo potencial de carga polínica e voo entre indivíduos, insuficiente para garantir a reprodução de uma espécie ameaçada com poucos indivíduos e populações fragmentadas.

O sucesso reprodutivo de *L. concinna* está comprometido pelo número reduzido de plantas e baixa frequência de polinizadores. Nossos resultados de limitação de polinizadores e baixo sucesso reprodutivo corroboram o fluxo gênico restrito e alta taxa de endogamia em populações de *L. concinna* mostrados por Araneda et al. 2011.

Considerações finais

Flores de *L. concinna* são recursos importantes para a reprodução de *M. postica*, mas a polinização por estas abelhas contribui pouco para a formação de frutos e não garante o transporte suficiente de pólen entre indivíduos e populações necessários para esta planta ameaçada de extinção.

A reintrodução de indivíduos de *L. concinna* nos locais de ocorrência da espécie seria recomendada para aumentar suas populações e os recursos polínicos para abelhas, uma vez que esta planta é fonte de uma grande quantidade destes recursos. Com mais recursos polínicos, *Manuelia postica* e possivelmente outras abelhas nativas poderiam ser mais frequentes e potencializar as chances de polinização, melhorando a aptidão desta espécie em estado crítico de ameaça.

Estudos dos efeitos da espécie exótica *B. terrestris* sobre a polinização de abelhas nativas em *L. concinna* são necessários, considerando o aumento desta espécie e a diminuição de *B. dahlbomii* que poderia ser um potencial polinizador na área de ocorrência desta planta.

O conhecimento do sistema reprodutivo *L. concinna* seria fundamental para verificar se a formação de frutos depende exclusivamente da polinização cruzada, o que reforçaria a necessidade de aumento de polinizadores eficientes que não se saciassem ao visitar poucas flores em um mesmo indivíduo.

Referencias

Aizen, M.A., Morales, C.L., Vazquez, D.P., Garibaldi, L.A., Saez, A., Harder, L.D. (2014) When mutualism goes bad: density-dependent impacts of introduced bees on plant reproduction. *New Phytologist* 204, 322-328

Altamirano, A., Echeverría, C., Lara, A. (2007) Efecto de la fragmentación forestal sobre la estructura vegetacional de las poblaciones amenazadas de *Legrandia concinna* (Myrtaceae) del centro-sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 80, 27-42

Araneda, C.M., Premoli, A.C., Echeverría, C., Thomas, P., Hechenleitner, P. (2011) Restricted gene flow across fragmented populations of *Legrandia concinna*, a threatened Myrtaceae endemic to south-central Chile. *Bosque (Valdivia)* 32(1), 30-38

Barrows, E.M., Chabot, M.R., Michener, C.D., Snyder, T.P. (1976) Foraging and mating behavior in *Perdita texana* (Hymenoptera: Andrenidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 49, 275-279

Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, 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

Burgett, M., Sukumalanand, P., Vorwohl, G. (2005) Pollen species resources for *Xylocopa (Nyctomelitta) tranquebarica* (F.), a night-flying carpenter bee (Hymenoptera: Apidae) of Southeast Asia. *Science Asia* 31, 65-68

- Cunningham, S.A. (2000) Depressed pollination in habitat fragments causes low fruit set. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267, 1149-1152
- Dafni, A., Kevan, P.G., Husband, B.C. (2005) *Practical Pollination Ecology*. Enviroquest, Cambridge, Canada
- Daly, H.V., Michener, C.D., Moure, J.S., Sakagami, S.F. (1987) The relictual bee genus *Manuelia* and its relation to other Xylocopinae (Hymenoptera: Apoidea) *Pan-Pacific Entomologist* 63, 113-268
- Duncan, D., Nicotra, A., Cunningham, S. (2004) High self-pollen transfer and low fruit set in buzz-pollinated *Dianella revoluta* (Phormiaceae). *Australian Journal of Botany*, 52, 185-193
- Engel, M.S. (2012) On the classification of the bee genus *Manuelia* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Slovenica* 20, 65-72
- Esterio, G.R., Cares-Suárez, R., Salinas, P. et al. (2013) Assessing the impact of the invasive buff-tailed bumblebee (*Bombus terrestris*) on the pollination of the native Chilean herb *Mimulus luteus*. *Arthropod-Plant Interactions* 7, 467-474
- Fernández, J.D., Bosch, J., Nieto-Ariza, B., Gomes, J.M. (2012) Pollen limitation in a narrow endemic plant: geographical variation and driving factors. *Oecologia* 170, 421-431
- Flores-Prado, L., Chiappa, E., Niemeyer, H.M. (2008) Nesting biology, life cycle, and interactions between females of *Manuelia postica*, a solitary species of the Xylocopinae (Hymenoptera: Apidae). *New Zealand Journal of Zoology* 35, 93-102

Flores-Prado, L., Flores, S.V., McAllister, B. (2010) Phylogenetic relationships among tribes in Xylocopinae (Apidae) and implications on nest structure evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57, 237-244

Flores-Prado, L. (2012) Ecología trófica de *Manuelia* (Hymenoptera: Apidae): actividad de forrajeo y análisis palinológico. *Entomología Mexicana* 12, 232-237

Garibaldi, L.A. et al. (2013). Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science* 339, 1608-1611

Goulson D. (2003). Effects of introduced bees on native ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34, 1-26

Hechenleitner, P., Gardner, M.F., Thomas, P.I., Echeverría, C., Escobar, B., Brownless, P., Martínez, C. (2005) Plantas amenazadas del Centro-Sur de Chile. Distribución, conservación y propagación. Univ. Austral de Chile, Real Jardín Botánico Edimburgo, 187 pp

Hongjamrassilp, W., Warrit, N. (2014) Nesting biology of an Oriental carpenter bee, *Xylocopa (Biluna) nasalis* Westwood, 1838, in Thailand (Hymenoptera, Apidae, Xylocopinae). *Journal of Hymenoptera Research* 41, 75-94

Hussain, A., Abdulaziz, S.A., Mohamed, S., Michael, S.E. (2016) Notes on the nesting biology of the small carpenter bee *Ceratina smaragdula* (Hymenoptera: Apidae) in northwestern Pakistan. *Florida Entomologist* 99(1), 89-93

Inoue, M.N., Yokoyama, J., Washitani, I. (2008) Displacement of Japanese native bumblebees by the recently introduced *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Conservation* 12, 135–146

Kearns, C.A., Inouye, D.W., Waser, N.W. (1998) Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29, 83-112

Kenta T., Inari, N., Nagamitsu, T., Goka, K., Hiura, T. (2007) Commercialized European bumblebee can cause pollination disturbance: An experiment on seven native plant species in Japan. *Biological Conservation* 134, 298-309

Landrum, L. (1988) The myrtle family (Myrtaceae) in Chile. *Proc. Cal. Acad. Sci.* 45 (12), 289-291

Landrum, L. (1986) *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium* and *Luma* (Myrtaceae). *Flora Neotropica. Monograph* 45, 131-133

Lucas, E.J., Harris, S.A., Mazine, F.F., Bellsham, S.R., Lughadha, E.M.N., Telford, A., Gasson, P.E., Chase, M.W. (2007) Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56, 1105-1128

Larsson, M., Franzén, M. (2007) Critical resource levels of pollen for the declining bee *Andrena hattorfiana* (Hymenoptera, Andrenidae). *Biological Conservation* 134, 405-414

Lucia, M., Telleria, M.C., Ramello, P.J., Abrahamovich, A.H. (2017) Nesting ecology and floral resource of *Xylocopa augusti* Lepeletier de Saint Fargeau (Hymenoptera, Apidae) in Argentina. *Agricultural and Forest Entomolog*, DOI: 10.1111/afe.12207

Madjidian, J., Morales, C., Smith, H. (2008) Displacement of a native by an alien bumblebee: lower pollinator efficiency overcome by overwhelmingly higher visitation frequency. *Oecologia* 156(4), 835-845

Michener, C.D. (2007) The bees of the world. The John Hopkins Univ. Press, Baltimore, Maryland, 953 pp.

Minckley, R.L., Wcislo, W.T., Yanega, D., Buchmann, S.L. (1994) Behavior and phenology of a specialist bee (*Dieunomia*) and sunflower (*Helianthus*) pollen availability. *Ecology* 75, 1406-1419

Morales, C. (2007). Introducción de abejorros (*Bombus*) no nativos: causas, consecuencias ecológicas y perspectivas. *Ecología Austral* 17, 51-65

Morales, C.L., Arbetman, M.P., Cameron, S.A., Aizen, M.A. (2013) Rapid ecological replacement of a native bumble bee by invasive species. *Frontiers in Ecology and the Environment* 11, 529-534

Müller, A., Diener, S., Schnyder, S., Stutz, K., Sedivy, C., Dorn, S. (2006) Quantitative pollen requirements of solitary bees: implications for bee conservation and the evolution of bee-flower relationships. *Biological Conservation* 130, 604-615

Novoa, R., Villaseca, S. (1989) Mapa Agroclimático de Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile. 221 pp.

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(6), 345-353

Quinalha, M.M., Nogueira, A., Ferreira, G., Guimarães, E. (2017) Effect of mutualistic and antagonistic bees on floral resources and pollination of a savanna shrub. *Flora* 232, 30-38

Rego J.O., Oliveira R., Jacobi, C.M., Schlindwein, C. (2017) Constant flower damages caused by a common stingless bee puts survival of a threatened buzz-pollinated species at risk. *Apidologie*, DOI 10.1007/s13592-017-0552-0

Ruz, L., Vivallo, F. (2005) Las abejas de la cordillera de Nahuelbuta, en Smith-Ramírez, C., Armesto, J.J., Valdovinos, C. (eds.) *Historia, biodiversidad y ecología de los bosques costeros de Chile*, pp. 369-388. Editorial Universitaria, Santiago, 710 pp

Ruz, L., Herrera, R. (2001) Preliminary observations on foraging activities of *Bombus dahlbomii* and *Bombus terrestris* (Hym: Apidae) on native and non-native vegetation in Chile, *Acta Horticulturae* 561, 165-169

Sakagami, S.F., Michener, C.D. (1987) Tribes of Xylocopinae and origin of the Apidae. *Annals of the Entomological Society of America* 80, 439-450

Scheper, J., Reemer, M., van Kats, R., Ozinga, W.A., van der Linden, G.T.J., Schaminée, J.H.J., Sijpe, H., Kleijn, D. (2014) Museum specimens reveal loss of pollen host plants as key factor driving wild bee decline in The Netherlands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 17552-17557

Schlindwein, C., 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 cancelata* (Malvaceae). *Plant Systematics and Evolution* 224, 183-194

Schlindwein, C., Pick, R.A., Martins, C.F. (2009) Evaluation of oligolecty in the Brazilian bee *Ptilothrix plumata* (Hymenoptera, Apidae, Emphorini). *Apidologie* 40, 106-116

Schindwein, C., Wittmann, D., Martins, C.F., Hamm, A., Siqueira, J.A., Schiffler, D., Machado, I.C. (2005) Pollination of *Campanula rapunculus* L. (Campanulaceae): how much pollen flows into pollination and into reproduction of oligolectic pollinators? *Plant Systematic and Evolution* 250, 147-156

Schmid-Hempel, R., Eckhardt, M., Goulson, D., Heinzmann, D., Lange, C., Plischuk, S., et al. (2014) The invasion of southern South America by imported bumblebees and associated parasites. *Journal of Animal Ecology* 83, 823-837

Solís-Montero, L., Vallejo-Marín, M. (2017). Does the morphological fit between flowers and pollinators affect pollen deposition? An experimental test in a buzz-pollinated species with anther dimorphism. *Ecology and Evolution*. 7(8), 2706-2715

Solís-Montero, L., Vergara, C. H., Vallejo-Marín, M. (2015) High incidence of pollen theft in natural population of buzz-pollinated plant. *Arthropod-Plant Interaction* 9, 599-611

Tepedino, V.J., Bowlin, W.R., Griswold, T.L. (2012) Pollinators complicate conservation of an endemic plant: *Physaria obcordata* (Cruciferae) in the Piceance Basin, Colorado. *Natural Areas Journal* 32(2), 140-148

Traveset, A., Richardson, D. (2006) Biological invasions as disruptor of plant reproductive mutualisms. *Trends in Ecology and Evolution* 21, 208-216

Vivarelli, D., Petanidou, T., Nielsen, A., Cristofolini, G. (2011) Small-size bees reduce male fitness of the flowers of *Ononis masquillierii* (Fabaceae), a rare endemic plant in the northern Apennines. *Botanical Journal of the Linnean Society* 165, 267-277

Wolf, S., Moritz, R.F.A. (2008). Foraging distance in *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* 39, 419-427

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho apresentou as características reprodutivas de três espécies raras, endêmicas e ameaçadas de extinção e suas interações com os polinizadores. Cada espécie apresentou peculiaridades intrínsecas que as tornam ameaçadas em associação com as causas externas.

Os danos florais em *Eriocnema fulva* diminuem o seu sucesso reprodutivo tanto pela perda de flores quanto pela diminuição da atratividade de polinizadores. Uma baixa taxa de visitação, e conseqüentemente baixa produção de frutos, é encontrada também nas outras duas espécies de estudo, *Solanum graveolens* e *Legrandia concinna*. Todas as três espécies apresentam populações pequenas, o que as tornam pouco atrativa a polinizadores.

O papel das abelhas, de maneira geral, para a polinização das plantas é indiscutível, porém a interação abelha-planta nem sempre é mutualística, por isso deve ser avaliada como nos casos descritos neste trabalho. Abelhas de *Trigona fulviventris* são polinizadoras de muitas espécies, porém coletam pólen ilegalmente em *Eriocnema fulva*, diminuindo o sucesso reprodutivo dessa espécie. *Legrandia concinna* oferece pólen para o provisionamento de larvas de *Manuelia postica*, que pouco contribui para a polinização desta planta. *Bombus terrestris*, espécie exótica, parece contribuir para a polinização cruzada de *Legrandia concinna*, embora possa ter efeitos negativos sobre abelhas nativas.

As características andromonóicas de *Solanum graveolens*, como possuir mais flores hermafroditas, associadas ao assincronismo de floração, poderiam ser vantajosas para o

seu sucesso reprodutivo, no entanto a baixa densidade de plantas da espécie diminui provavelmente a produção de frutos.

O cultivo destas espécies e sua reintrodução serão importantes para aumentar a atratividade de polinizadores e o sucesso reprodutivo destas plantas. Durante o doutorado, realizei estudos sobre germinação de *Eriocnema fulva* e *Solanum graveolens*. Estes estudos não estão apresentados nesta tese, mas serão publicados em breve, que juntamente com o trabalho sobre germinação de *Legrandia concinna* elaborado por outro autor e já publicado, poderão subsidiar o cultivo destas espécies.

A preservação do habitat onde estas plantas ocorrem é fundamental para o aumento dos visitantes florais na comunidade em geral. As três espécies sofrem ameaças pela destruição de habitat que é a causa principal do declínio das abelhas. A reintrodução destas espécies e a preservação de habitats devem considerar a conectividade entre as populações. As três espécies, além de possuir populações pequenas, estas populações estão distantes e/ou isoladas e não se encontram em áreas protegidas, com exceção de três populações de *S. graveolens* (RPPN Caraça, Estação Ecológica de Caratinga, Estação Biológica de Santa Cândida) e uma de *Eriocnema fulva* (APA das Andorinhas). Populações das três espécies devem estar protegidas, em áreas públicas ou privadas, garantindo a conservação *in situ* destas espécies.

A conservação *in situ* deve estar aliada à conservação *ex situ*. Considerando a crescente destruição de habitat e a raridade destas espécies, seus germoplasmas devem ser preservados em banco de sementes e coleções vivas para planos de reintrodução. Estudos sobre a variabilidade genética de *Eriocnema fulva* e *Solanum graveolens* são necessários para planos de reintrodução, e estes estudos já foram realizados para *Legrandia concinna*.

Os resultados aqui apresentados sobre a reprodução e interação com polinizadores devem ser considerados para a conservação destas espécies raras. Seria recomendado que fossem elaborados planos de ações para a conservação das três espécies e planos de manejo para as áreas onde estas ocorrem, considerando estes resultados. Com o rápido e crescente processo de extinção de plantas e a falta de recursos financeiros para ações efetivas para conter a perda da biodiversidade, espécies raras e endêmicas devem ser priorizadas, e as informações aqui apresentadas são fundamentais para as estratégias de conservação destas espécies.