

IPEF, n.34, p.47-52, dez.1986

**ESTUDO DA DISPERSÃO DE PÓLEN DE *Eucalyptus saligna* SMITH
POR ABELHAS *Apis mellifera* L. UTILIZANDO-SE O
RADIOFÓSFORO ³²P.**

IVANIA ATHIÉ PACHECO

ESALQ-USP, Pós-Graduarlda em Entomologia
13400 - Piracicaba - SP

PAULO YOSHIO KAGEVAMA

ESALQ-USP, Departamento de Ciências Florestais
13400 - Piracicaba - SP

FREDERICO MAXIMILIANO WIENDL

ESALQ-USP, Pesquisador do CENA
13400 - Piracicaba - SP

EVONEO BERTI FILHO

ESALQ-USP, Departamento de Entomologia
13400 - Piracicaba - SP

ABSTRACT - The activity of *Apis mellifera* L. bees as pollinator vector was studied in a clonal seed orchard of *Eucalyptus saligna* Smith, using the radio phosphorus ³²P. Two central trees of the orchard were marked by application of radioactive solution (Na₂H³²PO₄) in their stems, and four beehives of *A. mellifera* were established near to these trees. After it was verified that pollen of the trees was marked, flowers and bees were collected in trees covering an 11 the area of the orchard, besides the capture of bees in the entrance of the hives, aiming at the detection of the radioactive element. The applied method showed to be effective for the study of pollen dispersion of that species. It was observed that *A. mellifera* bees collected pollen of different plant species in one collection visit. *A. mellifera* showed very effective in promoting the cross pollination in *E. saligna*; the greater activity of the bees was up to 100 meters from the hives and decreasing gradually up to the studied distance of 300 meters.

RESUMO - A atividade da abelha *Apis mellifera* L. como agente polinizador foi estudada em um Pomar de Sementes Clonal de *Eucalyptus saligna* Smith, utilizando-se o radiofósforo ³²P. Marcaram-se duas árvores centrais do pomar aplicando-se a solução radioativa (Na₂H³²PO₄) no tronco das duas árvores e instalaram-se próximas a elas quatro colméias de *A. mellifera*. Depois de verificada a marcação do pólen das árvores, coletaram-se flores e abelhas de árvores cobrindo toda a extensão do pomar, além da coleta de abelhas à entrada das colméias, visando à detecção do elemento radioativo. O método mostrou-se efetivo para o estudo da dispersão de pólen da espécie. As campeiras de *A. mellifera* puderam coletar pólen de espécies vegetais diferentes em uma única viagem de coleta. *A. mellifera* mostrou-se efetiva em promover polinização cruzada em *E. saligna*,

sendo maior a atividade até 100 metros de distância das colméias e decrescendo gradativamente até a distância estudada de 300 metros.

INTRODUÇÃO

A eficiência da abelha **Apis mellifera** L. como agente polinizador, resultando em benefícios quantitativos e qualitativos, já foi comprovada para várias culturas de importância econômica, sendo que a introdução de colméias na época de florescimento é técnica recomendada e freqüente em vários países.

As abelhas são citadas como um dos principais transportadores de pólen em espécies de eucaliptos. Nesta cultura a polinização é geralmente entomófila, sendo a polinização cruzada altamente importante para espécies alógamas, tais como a maioria das espécies de eucaliptos.

Estudos sobre a introdução de colméias e comportamento das abelhas em Pomar de Sementes de eucaliptos assumem importância porque, apesar de **Apis mellifera** L. ser constantemente citada como freqüente visitante das flores de eucalipto, pouco ainda se sabe sobre seus hábitos e eficiência como agente polinizador nessas espécies.

O radioisótopo ^{32}P tem sido utilizado com eficiência para a marcação de pólen de várias espécies vegetais por diversos autores, visando à determinação dos padrões de distribuição de pólen em populações.

GRAHAM JR. (1957) fez experimentos de marcação de pólen, injetando ^{32}P no tronco de espécies folhosas decíduas e de coníferas. As marcações foram feitas retirando-se discos da casca e colocando-se a solução contendo ^{32}P em contato com a selva através de seringa e, pelo método de Graham, 1954, inserindo-se no tronco frascos contendo solução radioativa. Verificou o autor que em plantas decíduas, antes da queda das folhas, o movimento do ^{32}P é lento e irregular, enquanto que em coníferas se distribui amplamente através da planta, mas não uniformemente entre os galhos. Concluiu ainda que o pólen de coníferas pode ser marcado através de ^{32}P introduzido dentro do tronco ou dos galhos.

KOSKI (1970) , com a finalidade de verificar o papel da autopolinização e autofertilização em **Pinus silvestris**, marcou os grãos de pólen de árvores dessa espécie utilizando como agente marcador o radioisótopo ^{32}P . O autor fez seis orifícios ao redor dos troncos das árvores selecionadas para o experimento e aplicou solução aquosa de ortofosfato contendo ^{32}P . Após uma semana fez novos orifícios entre os já existentes, fazendo nova aplicação de solução radioativa.

CHARRIER (1971) marcou cafeeiros (**Coffea canephora** e híbridos de **congusta**), aplicando injeções de solução contendo ^{32}P ou ^{35}S na base do tronco, fazendo reaplicações periódicas. O autor avaliou os pólenes radioativos produzidos pelos cafeeiros marcados encontrados sobre os estigmas das flores dos cafeeiros circunvizinhos.

MASSAUX et alii (1976) verificaram a distribuição dos grãos de pólen do cacauero, realizando marcação das flores através de métodos de marcação externa e interna. O primeiro método constou da deposição de uma gota de solução radioativa contendo ^{32}P com atividade aproximada de 5 mCi/ml sobre cada flor recentemente aberta. A marcação interna consistiu na raspagem superficial dos pedúnculos de um certo número de botões florais prestes a abrir e, a seguir, da deposição de duas gotas da solução marcadora, tapando-se o local firmemente com massa.

THOR, WOODS & YANDELL (1976) utilizaram ^{32}P para marcação de grãos de pólen em um pomar de sementes de **Liriodendron tulipifera**, injetando solução de

$H_2^{32}PO_4HCl$ dentro do tronco e concluíram que esse método pode ser usado para marcar insetos carregadores de pólen de uma árvore fonte para uma árvore receptora.

Em trabalho pioneiro realizado no Brasil, AMARAL (1972) determinou o raio de ação de **Apis mellifera** L em cafezal florido, utilizando o radioisótopo ^{32}P na marcação de duas colmeias e verificou a coleta de pólen por essas abelhas, antes, durante e após a florada do cafezal. As abelhas foram marcadas com solução contendo ^{32}P adicionada a um xarope de açúcar colocado em alimentadores no interior das colméias. Os resultados obtidos indicaram que as abelhas trabalham nas flores do cafeeiro especialmente nas proximidades de sua colméia, possuindo atividade decrescente, mas sendo considerável até a 100 metros de distância das colméias.

O radiofósforo ^{32}P foi utilizado no presente trabalho com o objetivo de determinar o comportamento de **Apis mellifera** L. como agente polinizador em Pomar de Sementes de **E. saligna** Smith, bem como a atividade dessas abelhas em relação à distância das colméias.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada num Pomar de Sementes Clonal de **Eucalyptus saligna** Smith, de 9,2 ha de área e espaçamento de 10 metros x 10 metros, situado no Horto Areia Branca, Município de Casa Branca-SP, Pertencente à Companhia Champion de Papel e Celulose Ltda., em meados de outubro de 1979.

Utilizaram-se colméias do tipo Langstroth com aproximadamente 50.000 abelhas da espécie **Apis mellifera** L. em cada uma, sendo instaladas 4 colméias no pomar, num ponto central, em 10/10/1979, época de maior florescimento.

Para a coleta de pólen à entrada das colméias, utilizou-se de um caçador de pólen, que consistiu de 2 telas paralelas de malhas quadradas de 0,5 cm de lado e distanciadas de 1 cm, montadas em um quadro de madeira. O caçador foi adaptado à entrada das colméias, contendo um receptor de pólen logo abaixo.

Aplicou-se uma solução radioativa de fosfato ácido de sódio no tronco de duas árvores em florescimento, localizadas nas proximidades das colmeias, com auxílio de uma seringa. Utilizou-se para a marcação das árvores um total de 6,0 ml de $Na_2H^{32}PO_4$, contendo atividade de 50,15 mCi, sendo aplicado 1,5 ml cor respondendo a 12,54 mCi na árvore de porte menor (5 metros de altura) e 4,5 ml correspondente a 37,67 mCi na árvore de porte maior (10 metros de altura). A árvore menor foi marcada injetando-se a solução em dois orifícios feitos no tronco a 0,50 m do solo. A marcação da árvore de porte maior foi realizada fazendo-se dois orifícios no tronco, sendo um a 0,90 e outro a 1,15 m do solo, em uma das bifurcações da árvore; na outra ramificação foram feitos dois orifícios, sendo um a 1,0 m e outro a 0,90m do solo. Os orifícios foram feitos com auxílio de uma broca perfuradora, com uma profundidade de aproximadamente 5 cm, onde se injetou a solução marcadora. Após a injeção da solução, os furos foram vedados com massa de epoxi e fita adesiva.

Fez-se coleta de flores das árvores marcadas nos dois dias subsequentes e comprovando-se que estavam marcadas pelo método de cintilação líquida, coletaram-se flores das árvores do pomar em linhas alternadas, de modo a abranger toda sua extensão. Coletaram-se abelhas e pólen à entrada das colméias e abelhas em todas as árvores do pomar onde foram encontradas visitando as flores. Anotou-se a localização das árvores de cada amostra obtida.

Separaram-se os estames e pistilos das flores obtidas de cada árvore e retirou-se a carga de pólen das corbículas das abelhas. Colocaram-se isoladamente abelhas, pólen, estames e pistilos obtidos de cada árvore, assim como abelhas e pólen à entrada das colméias, em frascos de cintilação contendo 10 ml de solução cintiladora (5,0g de 2,5 diphenyloxazole em 1 litro de tolueno) , fazendo-se contagens no cintilador líquido por um minuto.

Adotou-se o método de contagem através de cintilador líquido por apresentar maior eficiência, conforme comprovado por NASCIMENTO FILHO e WIENDEL (1972), que compararam os sistemas Geiger-Müller com janela e cintilador líquido para detecção de *Apis mellifera* L. marcados com ^{32}P . Estes autores concluíram que o sistema de cintilação líquido é aconselhável, porque permite maior eficiência na detecção das amostras com menor radioatividade.

Aplicou-se o teste de X^2 visando comparar porcentagem de abelhas encontradas marcadas e não marcadas a diferentes distâncias das árvores fontes. Utilizou-se a análise de regressão linear para relacionar os dados de porcentagem de árvores que apresentaram flores marcadas com as respectivas distâncias das árvores fontes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados médios das contagens líquidas de pólen e abelhas coletadas à entrada das colméias estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados médios das contagens líquidas de pólen e abelhas com marcação radioativa, capturadas à entrada das colméias 2 e 4 dias após a aplicação de solução radioativa no tronco de duas árvores do pomar (dados de contagens médias corrigidos em relação ao 19º. dia de captura).

Material	No. capturado	No. encontrado marcado	Contagens médias (com)	Desvio padrão (s)
Pólen	40	21	230,29	680,99
Abelha	41	20	196,85	435,54

Verifica-se, pela grande proporção de cargas de pólen e abelhas marcadas em relação ao total capturado, que as árvores marcadas foram grandemente visitadas pelas abelhas para coleta de pólen e néctar, devido provavelmente à sua localização próxima às colméias, bem como ao seu abundante florescimento.

Observaram-se variações nas colorações das cargas de pólen capturadas (esverdeado, amarelado e avermelhado), evidenciando que se constituíam de misturas de pólen provenientes de espécies vegetais diferentes. Pelas colorações observadas nos grãos de pólen, deduz-se que as abelhas coletaram pólen de outras espécies além do eucalipto, cujo pólen é amarelo esverdeado, mostrando que em uma única viagem visitaram flores de mais de uma espécie vegetal.

O alto desvio padrão obtido das contagens de pólen e abelhas sugere uma diferença na quantidade de material radioativo entre as cargas de pólen e néctar obtido pelas abelhas. Como algumas massas de pólen de coloração avermelhada e rósea apresentaram-se marcadas, evidencia-se que nesses casos as campeiras visitaram a árvore marcada e também outra espécie vegetal presente nas proximidades ou mesmo na vegetação do Pomar

de Sementes. Observaram-se também alguns casos em que apenas as abelhas ou suas cargas de pólen se mostraram marcadas, sugerindo: no caso de apenas as abelhas marcadas, que se alimentaram de néctar da árvore marcada e coletaram pólen de outra árvore ou; no caso de apenas o pólen marcado, que apenas coletaram pólen da árvore marcada, não se alimentando de néctar.

Essas observações contrariam a afirmação de Muller (1882), citado por GRANT (1950), que diz que a constância da abelha é mantida não somente através de um determinado vôo de coleta, mas também por um período de dias. Por outro lado, o autor analisou as observações de vários pesquisadores, concluindo que *Apis mellifera* L. são constantes quanto à espécie de flor que visitam e que uma certa inconstância, algumas vezes maior outra menor, é um componente normal do comportamento da abelha.

Contrariam também as observações de FAEGRI e VAN DER PIJL (1976) quanto à constância na coleta de pólen de *Apis mellifera* L. Estes autores relatam análises de pólen das corbículas de *Apis mellifera* L., por vários pesquisadores revelaram, em muitos casos, uma dupla ou muitas vezes múltipla constância na coleta de pólen.

Com os resultados das contagens em cintilador líquido das abelhas capturadas nas árvores do pomar e que se mostraram marcadas, procurou-se estabelecer uma relação quantitativa entre os materiais encontrados marcados (pólen e abelhas) e a distância das árvores marcadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados de coleta de abelhas a diferentes distâncias das árvores marcadas , 22 dias após a aplicação da solução radioativa.

Distância das fontes radioativas	Nº de abelhas marcadas	Nº de abelhas não marcadas	Total
0 - 150	8	3	11
150-300	6	12	18
Total	14	15	29

A dificuldade encontrada na captura das abelhas devido à altura das árvores resultou numa amostragem muito pequena (29 abelhas), não sendo suficiente para se determinar equação de regressão da porcentagem de abelhas encontradas marcadas em relação à distância das fontes radioativas e colméias. Os dados foram então analisados pelo teste de X^2 , a fim de se verificar se o número de abelhas encontradas marcadas de 0 a 150 metros das árvores fonte diferiu do número de abelhas marcadas de 150 a 300 metros. O resultado obtido ($X^2 = 4.244$, significativo ao nível de 5%) mostra que o número de abelhas encontradas marcadas diminuiu com a distância das fontes radioativas e, conseqüentemente, das colméias que se achavam bem próximas desta, constatando-se maior atividade das abelhas nas proximidades das suas habitações.

Os dados obtidos nas coletas de flores do pomar foram analisados em relação à distância das fontes radioativas. Na Tabela 3 encontram-se os dados obtidos.

Tabela 3 - Resultados obtidos das coletas de flores do pomar a diversas distâncias das árvores fontes de radiação.

Distância das árvores marcadas (m)	Nº de amostras obtidas	Nº de amostras marcadas	Nº de árvores marcadas
0-50	07	06	85,71
50-100	28	24	85,71
100-150	19	15	78,95
150-200	15	11	73,33
200-250	11	07	63,64
250-300	09	05	55,56
TOTAL	89	68	76,40

A partir dos dados da Tabela 3 obteve-se a equação de regressão, $y = 96,075 - 0,127x$ ($r = 0,974$), mostrando que existe uma correlação negativa entre o número de árvores cujas flores se apresentaram marcadas e a distância das árvores fontes. O gráfico correspondente está representado na Figura 1.

Nota-se ainda pela Tabela 3 que a percentagem de árvores encontradas com flores marcadas foi maior e manteve-se constante até a distância de 100 m das árvores fonte, caindo gradativamente com a distância. Esses resultados são coerentes com os obtidos através da captura de abelhas nas árvores do pomar (Tabela 2), pois se observou maior número de abelhas marcadas nas proximidades das árvores marcadas e também maior percentagem de árvores com flores marcadas.

É também evidente que a atividade das abelhas foi considerável por todo o pomar, pois transportaram pólen radioativo em todas as direções até a distância de 300 metros das árvores marcadas.

Fatos semelhantes aos obtidos com os resultados das Tabelas 2 e 3 foram relatados por vários pesquisadores, THOR, WOODS & YANDELL (1976) que, estudando o transporte de pólen marcado por abelhas em pomar de **Liriodendron tulipifera**, verificaram que as abelhas aparentemente viajaram em todas as direções da árvore fonte para outras árvores do pomar.

Também LEVIN (1960; 1961), utilizando-se da raça caucasiana de **Apis mellifera** L. marcadas com ^{32}P e da raça Cordovan (geneticamente marcada), introduzidas em campos de alfafa, verificou maior número de abelhas marcadas nas proximidades das colméias. De modo semelhante, LEE (1961) observou que abelhas marcadas geneticamente e através de ^{32}P não se distribuíram ao acaso em campos de mirtilos mas, de acordo com a Quantidade de alimento, de encontraram em maior número nas proximidades de suas colméias. Foi observado por LEE (1965), pesquisando abelhas marcadas geneticamente e através de ^{32}P ou em campos de mirtilos e pomar de maçãs, que há um rápido decréscimo em atração por uma fonte de alimento com o aumento da distância do apiário. Igualmente, AMARAL (1972) obteve resultados indicando que **Apis mellifera** L., marcadas com ^{32}p trabalharam nas flores do cafeeiro especialmente nas proximidades de suas colméias, possuindo uma atividade decrescente com a distância, sendo porém considerável até 100 metros das colméias.

O método de coleta de flores para avaliação da atividade das abelhas apresentou melhores resultados do que a captura das abelhas nas árvores do pomar, podendo-se obter maior número de amostras e conseqüentemente melhor avaliação dos dados devido a maiores facilidades de coleta. Um outro aspecto a ser analisado é que as abelhas capturadas nas árvores do pomar, e que se encontraram marcadas, poderiam ter adquirido essa radioatividade por visitas às árvores marcadas em vôos anteriores, através da obtenção de néctar da planta ou mesmo dentro das colméias através da alimentação, como foi comprovado por NIXON & RIBBANDS (1952/53). Estes autores marcaram abelhas com ^{32}P , através da alimentação com xarope de açúcar, e verificaram que a radioatividade pode ser transmitida através da alimentação dentro das colméias.

Com a obtenção das flores marcadas torna-se evidente que, em um único vôo, as abelhas adquiriram pólen das árvores marcadas e o transferiram para outras árvores realizando polinização cruzada, contrariando uma afirmação de GRANT (1950), segundo o qual a visita da abelha é confinada a um ramo por longo período, obviamente causando muita autopolinização. Discorda também de HODGSON (1974) que, observando flores de *E. grandis* e *E. cloeziana*, afirmou que as abelhas são raramente vistas a mover-se de um ramo para outro.

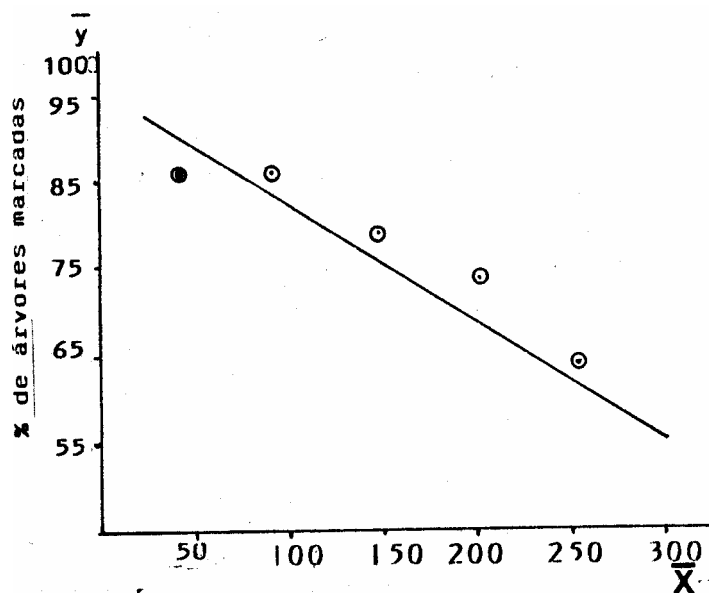


Gráfico 1 - Gráfico da equação $y = 96,075 - 0,127x$, da porcentagem de árvores que apresentaram flores marcadas, em função da distância das fontes radioativas ($r = -0,974$).

CONCLUSÕES

- O método de marcação utilizado, através de injeção de solução de $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ no tronco, é eficiente para marcação de pólen de *Eucalyptus saligna* para estudo de dispersão de pólen.
- As campeiras de *Apis mellifera* L. puderam coletar pólen de espécies vegetais diferentes e de mais de uma planta da mesma espécie, em uma única viagem de coleta.

- **Apis mellifera** L. é efetiva em promover polinização cruzada em **E. saligna**, sendo maior a atividade até 100 metros de distância das colméias, decrescendo gradativamente até a distância estudada de 300 metros.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Companhia Champion Papel e Celulose Ltda., à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP e ao Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF, que possibilitaram a realização deste trabalho.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AMARAL, E. Polinização entomófila de **Coffea arabica** L., raio de ação e coleta de pólen pela **Apis mellifera** Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) em cafezal florido. Piracicaba, 1972. 82p. (Tese-Livre-Docência-ESALQ).

CHARRIER, A. Étude de la pollinisation des caféiers cultivés par marquage du pollen au phosphore (^{32}P) et au soufre (^{35}S) radio-actifs. **Café, Cacao, The**, Paris, **15**(3): 181-90, 1971.

FAEGRI, K. & VAN DER PIJL, L. **The principles of pollination ecology**. Oxford, Pergamon Press, 1976. cap.5, p.17-158.

GRAHAM JR., B.F. Tabelling pollen of woody plants with radioactive isotopes. **Ecology**, Durham, **38**(1): 156-8, 1957.

GRANT, V. The flower constancy of bees. **The Botanical Review**, Lancaster, **16**: 379-98, 1950.

HODGSON, L.M. Some aspects of flowering and reproductive behaviour in **Eucalyptus grandis** (Hill) Maiden at J.D.M. Keet Forest Research Station. 1. flowering, controlled pollination methods, pollination and receptivity. **South African Forestry Journal**, Pretoria, (97): 18-28, 1976.

KOSKI, V. A study of pollen dispersal as a mechanism of gene flow in conifers. **Communicationes Instituti Forestalis Fenniae**, Helsinki, **70**(4):19-23, 1970.

LEE, W.R. The nonrandom distribution of foraging honey bees between apiaries. **Journal of Economic Entomology**, Menasha, **54**(5): 928-33, 1961.

LEE, W.R. Relation of distance to foraging intensity of honey bees (**Apis mellifera**) on natural food sources. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, **58**(1): 94-100, 1965.

LEVIN, M.D. A comparison of two methods of mass-marking foraging honey bees. **Journal of Economic Entomology**, Menasha, **53**(4): 431-4, 1961.

- LEVIN, M.D. Distribution of foragers from honey bee colonies placed in the middle of a large field of alfafa. **Journal of Economic Entomology**, Menasha, **54**(3): 431-4, 1961.
- MASSAUX, F. et alii. Étude du transport du pollen de Cacaoyer par marquage au ³²P. **Café, Cacao, The**, Paris, **20**(3): 163-72, 1976.
- NASCIMENTO FILHO, V.F. & WIENDL, F.M. Possibilidade de substituição do sistema detector Geiger-Müller pelo cintilador líquido, na medida da radioatividade da abelha africana *Apis mellifera* L., marcada com ³²P. **Boletim técnico CENA**, Piracicaba, 1: 1-38, 1972.
- NIXON, H.L. & RIBBANDS, C.R. Food transmission within the honey bee community. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, série B, **140**: 43-50, 1952/53.
- THOR, E., WOODS, F.W. & YANDELL, J.H. Pollen transport by bees in a yellow-poplar seed orchard. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, **1**(1): 31-5, 1976.