

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

EFEITO POLINIZADOR DE *Apis mellifera* EM FLORES DE
Brassica napus L. (HYOLA 432) E POTENCIAL PRODUTOR DE
SEMENTES, NO SUL DO BRASIL.

Annelise de Souza Rosa
Orientadora: Dra. Betina Blochtein

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PORTO ALEGRE – RS - BRASIL
2009

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
APRESENTAÇÃO.....	8
CAPÍTULO 1	9
CAPÍTULO 2	32
CONCLUSÕES GERAIS	52
ANEXOS	53

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todas as pessoas que, de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente...

Aos Professores da PUCRS que contribuíram para a realização desta pesquisa, especialmente à Profa. Dra. Betina Blochtein por ter aceitado me orientar, pelas críticas e ensinamentos relacionados aos trabalhos desenvolvidos. Agradeço ao Prof. Dr. João Feliz pelo auxílio na escolha dos testes estatísticos a serem aplicados aos dados obtidos no trabalho. Agradeço também ao Prof. Dr. Leandro Astarita pelo auxílio na preparação de material para análise de pólen.

Ao Dr. Nídio Barni pelo auxílio na escolha do cultivo estudado.

Ao Dr. Gilberto Tomm pela recomendação da área de estudo onde foi realizada a pesquisa.

Aos professores Marcos Garrafa, Valdir Benedetti e Dalziro Valdameri pela permissão da realização dos trabalhos de campo na Sociedade Educacional Três de Maio (SETREM). Agradeço infinitamente às demais pessoas dessa mesma instituição pela excelente estadia e hospitalidade, especialmente às gurias da cozinha (Angélica, Vânia e Chica), à Marli (artesanato), à Patrícia (secretaria) e aos motoristas (especialmente o Sr. Guido).

Agradeço imensamente a toda minha família, especialmente aos meus pais (Ione e Ronaldo). Um simples “obrigada” é muito pouco para agradecer a tudo o que eles fizeram e fazem por mim. Agradeço pelo carinho, apoio e compreensão em todas as etapas do meu trabalho. Saliento a minha imensa gratidão à minha mãe por ter me acompanhado e me auxiliado por várias vezes nas coletas de dados no campo. Minha gratidão também ao meu dindo (Getúlio) e à minha prima (Raquel) pelos constantes transportes até campo durante a minha iniciação científica que me proporcionaram experiência na área de pesquisa de polinização, e que agora refletiram no meu trabalho de mestrado.

Ao meu noivo (Lucas Fontana), que sempre esteve do meu lado, pelo amor, companheirismo e apoio em todos os momentos. Agradeço-o imensamente pela paciência e dedicação na edição das imagens para os meus manuscritos. Aos demais integrantes da Família Fontana pelo apoio e por proporcionar momentos de divertidas risadas.

À Andressa Paladini pela grande amizade, e por ter aceitado me acompanhar em diversas idas ao campo, mesmo sabendo que teria que pedalar 13km de chão batido com várias subidas e descidas para chegar até a lavoura de canola, se sujar de barro, ter que almoçar pão com sardinha e jantar galinha crua.

Minha gratidão ao Nadílson Ferreira pela parceria, por me acompanhar nas idas ao campo e pelas sugestões aos meus manuscritos. Agradeço também ao Diego Lima pelo auxílio nas coletas, na análise dos dados e pela ajuda na formatação de manuscritos.

À Sidia Witter, pelos seus valiosos e importantes ensinamentos, críticas e sugestões durante todo o desenvolvimento do meu trabalho.

À Letícia Lopes pelas imensas demonstrações de apoio desde as minhas pesquisas de iniciação científica, que refletiram de forma positiva no meu trabalho de mestrado.

Ao Ney Telles Ferreira Júnior pelo imenso auxílio na construção e instalação das armações de madeira para as coberturas dos tratamentos de polinização no campo.

À Daniela Loose Ferreira pela paciência relacionada aos constantes pedidos de revisão de leitura dos meus resumos, trabalhos e pelas valiosas sugestões na preparação dos manuscritos.

Aos demais amigos do laboratório, especialmente à Juliana Galaschi, pelos constantes abraços nos dias difíceis que antecederam à entrega da dissertação, e por me proporcionar diversos momentos “heavy metal”; à Bruna Ramos, Mariana “Z”aniol e Mateus Pavani pelos momentos de risadas e pela parceria rumo à academia; à Kátia Matiotti pelos momentos “fashion” do laboratório.

À minha professora de inglês (Maria Isabel de Araújo), pelos importantes ensinamentos na preparação para a prova de seleção do mestrado. À Profa. Gilka Ferreira pela revisão de manuscrito em inglês.

À PUCRS pela utilização da infra-estrutura que permitiu a realização dessa pesquisa.

Por fim, ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

Brassica napus L. é considerada autofértil, entretanto, estudos indicam que o forrageio de *Apis mellifera* L. eleva sua produtividade. Considerando-se a crescente importância da cultura no Rio Grande do Sul, avaliou-se o potencial polinizador de *A. mellifera* L. em flores de *B. napus* de acordo com as fenofases da antese e o incremento na produção através da indução de polinização. Os estágios da antese foram caracterizados e relacionados à receptividade do estigma e à viabilidade dos grãos de pólen. Paralelamente, o comportamento das abelhas nas flores foi acompanhado considerando-se as estruturas tocadas, os recursos coletados, o número de flores visitadas por planta, o tempo de permanência nas flores e a fidelidade floral. A frequência de visitas de insetos às flores foi registrada e relacionada ao desenvolvimento da cultura. A partir de testes de polinização (autogamia; visitação de insetos; polinização manual entre flores da mesma planta; polinização manual entre flores de plantas distintas) comparou-se a produtividade de siliquis e sementes. Dentre os insetos antófilos registrados Os Hymenoptera (92,35%) destacaram-se entre os insetos mais frequentes, dos quais 99,83% eram *A. mellifera*. Durante o forrageio as abelhas tocaram anteras e estigmas, visitaram entre 1-7 flores/planta, permaneceram nas flores de 1-43 segundos e carregaram exclusivamente grãos de pólen de *B. napus*. O período com potencial de polinização por *A. mellifera* ocorreu durante o segundo e terceiro estágios da antese e a relação entre a frequência dessas abelhas e o curso da floração foi significativamente positiva. A produtividade de sementes/planta elevou-se de 23,63% para 61,87% com indução de polinização. O forrageio das abelhas elevou a produtividade de *B. napus* e essa produção ainda poderia ser aumentada com o adensamento e manejo dirigido de abelhas na cultura durante o período de floração.

ABSTRACT

EFFECT POLLINATOR OF *Apis mellifera* ON FLOWERS OF *Brassica napus* L. (HYOLA 432) AND POTENTIAL SEED PRODUCER, IN SOUTHERN BRAZIL.

Brassica napus L. is considered self-fertile, although, studies indicate that the foraging from *Apis mellifera* L. increase its productivity. Considering the importance of the culture in Rio Grande do Sul, it was evaluated the pollinator potential of *A. mellifera* L. in *B. napus* flowers according to the anthesis phenophases and the increase in production through the pollination induction. The phases of anthesis were characterized and related to the stigma receptivity and the pollen grains viability. In parallel, the behavior of bees on flowers was followed considering the touched structures, the resources collected, the number of flowers visited by plant, the time of permanence on flowers and the floral fidelity. The frequency of insects visits to the flowers was registered and related to the development of the culture. From the pollination tests (autogamy; insects visits: handly pollination among flowers from the same plant: handly pollination among flowers from distinct plants) it was compared the productivity of siliquas and seeds. Including the visitors insects registered the Hymenoptera (92,35%) stood out among the most frequent insects, from which 99,83% were *A. mellifera*. During foraging the bees touched anthers and stigmas, visited among 1-7 flowers/plant, remained on the flowers for 1-43 seconds and carried only *B. napus* pollen grains. The period with potential of pollination by *A. mellifera* happened during the second and third phases of anthesis and the relation among the frequency of these bees and the flowering progress was significantly positive. The productivity of seeds/plant increased from 28,36% to 55,12% with pollination induction. Bees foraging increased the productivity of *B. napus*

and this production could still be increased with the rise and management of bees in the culture during the flowering period.

APRESENTAÇÃO

Brassica napus L., popularmente conhecida como canola, é um cultivo de inverno incorporado nos sistemas de produção de grãos no Sul do Brasil (Barni *et al.*, 1985; Tomm, 2007). Destaca-se como alternativa econômica pela produção de óleo apropriado para consumo humano (Cunha, 2007) e rentável para a produção de biodiesel (Tomm, 2007; Marjanovic-Jeromela *et al.*, 2008). A canola é considerada uma cultura autofértil (Free, 1993; Tomm, 2005). Entretanto, estudos indicam que os insetos, especialmente *Apis mellifera* L., através de seu comportamento de forrageio nas flores, podem elevar de forma significativa os índices de produtividade dessa cultura (McGrecor, 1976, Delaplane & Mayer, 2000; Sabbahi *et al.*, 2005; Abrol, 2007).

A presente pesquisa, relativa ao comportamento de forrageio de *A. mellifera* e ao incremento de produtividade de *B. napus* induzido por testes de polinização, é apresentada em dois capítulos. O primeiro trata das interações de *A. mellifera* com as flores de *B. napus* (cv. Hyola 432), de acordo com as fenofases da antese, objetivando verificar se essas abelhas possuem comportamento propício ao sucesso de polinização da cultivar em estudo, no Rio Grande do Sul. O segundo avalia os índices de incremento na produtividade de *B. napus* resultantes da atividade polinizadora de insetos, especialmente *A. mellifera*, e de testes de geitonogamia e xenogamia induzidos manualmente.

O capítulo 1 foi submetido como artigo à Revista Brasileira de Zoologia e o capítulo 2 será encaminhado como artigo à Pesquisa Agropecuária Brasileira.

CAPÍTULO 1

***Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) as a potential *Brassica napus* pollinator (cv. Hyola 432) (Brassicaceae), in southern Brazil**

Rosa, A. S.^{a*}, Blochtein, B.^a, Ferreira, N. R.^a and Witter, S.^b

^aDepartamento de Biodiversidade e Ecologia, Faculdade de Biociências, Laboratório de Entomologia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bCentro de Meteorologia Aplicada. Fundação Estadual de Pesquisa e Agropecuária. Rua Gonçalves Dias, 570 - Menino Deus, Porto Alegre 90130-060, RS, Brazil.

* annesouzar@gmail.com

(With 4 figures)

Palavras-chave: Abelhas melíferas; canola; comportamento; antese; polinização.

Keywords: Behavior; canola; honey bees; anthesis; pollination.

Abbreviated title: ***Apis mellifera* as a potential *Brassica napus* pollinator**

Abstract: *Brassica napus* Linnaeus is considered a self-compatible crop; however, studies show that bee foraging elevates their seed production. Considering bee food shortages during the winter season and that the canola is a winter crop, this study aimed to evaluate the foraging behavior of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 regarding those flowers, and to verify if it presents adequate behavior for successfully pollinating this crop in the Rio Grande do Sul State. The study was set forth in a canola field, in southern Brazil. The anthesis stages were morphologically characterized and then related to stigma receptivity and pollen grain viability. Similarly, the behavior of *A. mellifera* individuals on flowers was followed, considering the number of flowers visited per plant, the amount of time spent on the flowers, touched structures, and collected resources. Floral fidelity was inferred by analyzing the pollen load of bees collected on flowers. The bees visited from 1-7 flowers/plant ($\bar{x} = 2.02$; $sd = 1.16$), the time spent on the flowers varied between 1-43 seconds ($\bar{x} = 3.29$; $sd = 2.36$) and, when seeking nectar and pollen, they invariably touched anthers and stigmas. The pollen load presented 100% of *B. napus* pollen. The bees' attendance to a small number of flowers/plant, their short permanence on flowers, their contact with anthers and stigma and the integral floral constancy allows their consideration as potential *B. napus* pollinators.

Resumo: *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) como potencial polinizador de *Brassica napus* (cv. Hyola 432) (Brassicaceae), no sul do Brasil

Brassica napus Linnaeus é considerada uma cultura auto compatível, entretanto, estudos indicam que o forrageio de abelhas eleva sua produtividade de sementes. Considerando-se a

escassez de alimento para abelhas no inverno e a canola sendo uma cultura desse período, objetivou-se avaliar o comportamento de forrageio de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 nas suas flores e verificar se apresenta comportamento propício ao sucesso de polinização dessa cultura no Rio Grande do Sul. O estudo foi desenvolvido em lavoura de canola, no sul do Brasil. Os estágios da antese foram caracterizados morfológicamente e relacionados à receptividade do estigma e à viabilidade dos grãos de pólen. Paralelamente, o comportamento de indivíduos de *A. mellifera* nas flores foi acompanhado considerando-se o número de flores visitadas por planta, o tempo de permanência nas flores, as estruturas tocadas e os recursos coletados. A fidelidade floral foi inferida analisando-se a carga polínica de abelhas coletadas em flores. As abelhas visitaram entre 1-7 flores/ planta ($\bar{x} = 2.02$; $sd = 1.16$), o tempo de permanência nas flores variou entre 1-43 segundos ($\bar{x} = 3.29$; $sd = 2.36$) e, ao buscarem néctar e pólen, invariavelmente tocavam anteras e estigmas. A carga polínica apresentou 100% de pólen de *B. napus*. A visita a poucas flores/ planta, a curta permanência sobre as flores, o contato das abelhas com anteras e estigma e a plena constância floral, permitem considerá-las como potenciais polinizadoras de *B. napus*.

Introduction

Canola (Canadian oil low acid) is a genetically modified selection of the *Brassica napus* Linnaeus colza, developed in Canada. This annual herbaceous species is the third most produced oleaginous plant in the world, being mainly consumed in developed countries (Tomm, 2005). In the Rio Grande do Sul State, Brazil, it stands out as an excellent economic alternative for enabling the production of vegetable oils during the winter (Barni *et al.* 1985). An increasing interest on canola oil as a functional food source due to its excellent composition of fatty acids is observed (Cunha, 2007). Besides those

attributes, the high level of oil in its seed (40 to 46%) (Albuquerque *et al.*, 2007) makes it a good choice for the production of biodiesel (Albuquerque, 2006).

Seeking an increase in grain production worldwide, through technologies that consider weather-related aspects and vegetable nutrition, pollination is gradually being valued as studies indicated its contribution to farming (Imperatriz-Fonseca, 2004). Viable pollen grains must be deposited on suitable stigmas in order for plant sexual reproduction to occur. The efficiency in transferring pollen grains partially determines a species' reproductive success (Schlindwein *et al.*, 2005). Insects represent important vectors in this process (Kevan e Eisikowitch, 1990). Most vegetables from the Brassicaceae family, which are commercially exploited, are represented by hybrids whose seed production depends on entomophilous pollination (Syafaruddin *et al.*, 2006).

The pollinating efficiency of anthophilous insects is intimately related to the floral biology of the vegetable species and to their foraging behavior (Flores and Trindade, 2007). For a pollinating agent to be effective, this behavior should favor the transportation of anther pollen to flower stigmas on the same plant or different target species plants (Freitas and Paxton, 1996). Honey bees are included in this context, whose foraging behavior is favors the increase of crop productivity (D'Ávila and Marchini, 2005).

Bees feed almost exclusively on pollen and nectar (Masierowska, 2003) and need to visit a great number of flowers in order to satisfy the colony's needs (Corbet *et al.*, 1991). *B. napus* flowers are extremely attractive to them (Abrol, 2007) and its high level of attractiveness is related to its fragrance (Mussury and Fernandes, 2000) and to its abundant food resources (Williams, 1980; Mesquita *et al.*, 1988).

B. napus flowers are monoclinous, having four sepals, four petals, four long stamens, and two short stamens. They have four nectaries, two in each pair of long stamens

and two in the inner part of the short stamens (Free, 1993; Mussury and Fernandes, 200). The latter secrete a greater amount of nectar, with high concentrations of sugars, and are more easily accessible to insects during the entire anthesis period (Williams, 1980).

Even though *B. napus* is considered a self-compatible crop (Williams, 1978; Eisikowitch, 1981), susceptible to wind pollination (Gene Technology Regulator, 2002), bee foraging bees increases its productivity rate (McGregor, 1976; Delaplane and Mayer, 2000; Sabbahi *et al.*, 2005). Nevertheless, studies indicate that the most of the insect fauna which visits *B. napus* consists of honey bees. In the Georgia State (USA) those insects represent about 64% of flower visitors (Delaplane and Mayer, 2000), while in the São Paulo State (Brazil) its representation reaches 81% (Adegas and Nogueira-Couto, 1992). Kevan and Eisikowitch (1990) emphasize the effectiveness of these bees in transferring pollen grains.

Considering bee food shortages during the low temperature periods in the Rio Grande do Sul State and that the canola is a winter crop, this study aimed to evaluate the foraging behavior of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 on *B. napus* flowers and to verify if they present a potential pollinating behavior for this crop in the Rio Grande do Sul State.

Material and Methods

Area of study

The study was conducted in 13 ha of commercial crops of *B. napus* cultivar Hyola 432, belonging to the Sociedade Educacional Três de Maio (Três de Maio Educational Society) (27°46'24''S 54°14'24''W), 13 km from the head office of the Três de Maio municipality, in the Rio Grande do Sul State, Brazil. Data gathering was performed from July to August 2007, during the crop's florescence. This region has a moderate climate, being that temperature, precipitation and humidity averages reach, respectively, 14.6°C,

2.8mm and 74.6% during this period. Meteorological data were obtained from the applied meteorology center database of the Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO, State Foundation for Farming Research).

Anthesis and stigma receptivity

Flower development was studied on 80 flower buds in pre-anthesis, from 10 plants. From these 80 flower buds, 20 flowers were collected and analyzed on a daily basis. The anthesis is the flower's florescence period and the beginning of the stamens' and pistils' senescence (Faegri and Pijl, 1979).

From the marked flowers, the anthesis stages were characterized according to petal physiognomy, stamen position, dehiscence and pollen grain availability in anthers, stigma coloration and secretion and (using a digital caliper rule) pistil height.

Stigma receptivity was verified on eighty flower buds in pre-anthesis, from 10 plants. From these 80 flower buds, 20 flowers were collected on a daily basis and subjected to the stigma receptivity test. For this reason, the style of each flower was detached, using tweezers, and its tip immersed in a drop of hydrogen peroxide solution (3%) placed on a histological slide immediately after its detachment from the flower. The formation of blisters was identified under a stereoscopic microscope, indicating receptive stigmas (Dafni, 2005).

Pollen grain viability

In order to verify the presence of cytoplasmic content, 45 flower buds from 10 plants were randomly marked. As of the beginning of anthesis, 15 flowers were collected and their pollen grains contrasted to an acetic-carmin solution (Dafni, 2005) on a daily basis. Later, approximately 1,000 grains were counted under an optical microscope, in order to differentiate pollen grains with and without cytoplasmic content.

The pollen grain germination rate was estimated according to flower age, from 42 random flower buds pertaining to 10 plants. Following the methodology proposed by Bots and Mariani (2005), as of the beginning of anthesis, 14 flowers were collected and analyzed on a daily basis: two anthers from each flower were put in a 100µl culture medium (PGM: 0.01% H₃BO₃, 0.07% CaCl 2H₂O, 3.0% PEG 6000 and 20% saccharose), for pollen germination, and identified according to collection date, anthesis stage and duration of culture. After 2h and 4h of culture (seven flowers for each duration) the samples were fixed with formaldehyde (0.87%). Then, each sample was prepared in a histological slide and 1,000 pollen grains were counted under an optical microscope and the number of germinated and ungerminated grains was recorded.

Interactions between bees and flowers

In order to verify the number of open flowers found on each plant, florescence was followed through 120 plants, marked with colored ribbons, distributed throughout the extremities (4 points) and throughout the inner portion of the field (8 points). In order to follow florescence progression, the number of flowers on each plant's main inflorescence was counted, two times per week, during the entire florescence period.

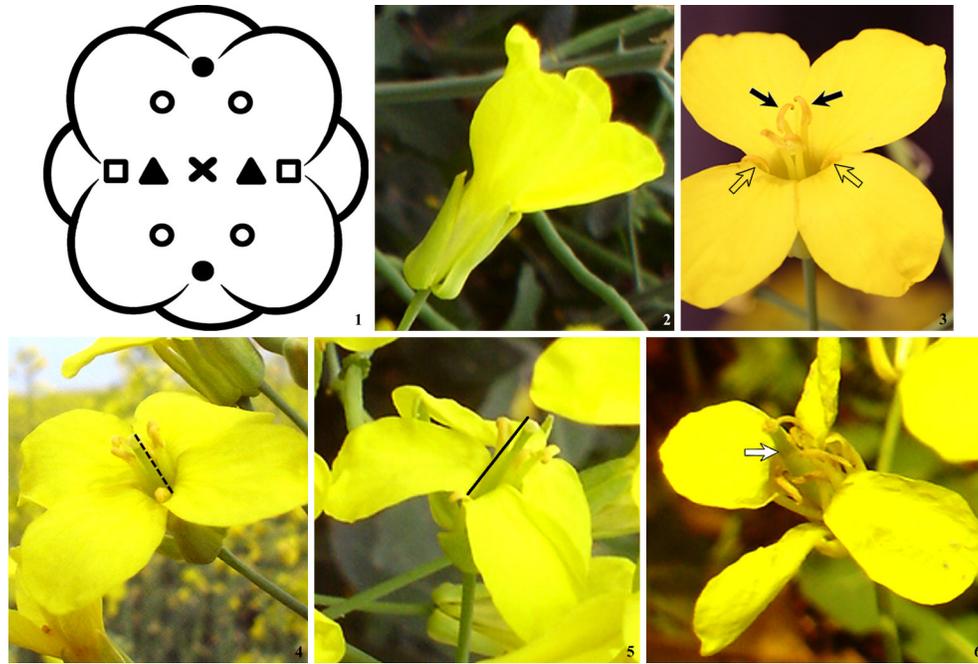
Interactions between bees and flowers were studied in temperature conditions above 12°C. The study was conducted for seven days, between June 24th, 2007 and July 22nd, 2007, during which 206 *A. mellifera* individuals were observed at three different hours, in periods of 30 minutes, counted from 12:30 PM, 2:30 PM and 4:30 PM. Their behavior was not evaluated in the morning due to low temperatures, which restricted their activities on the flowers. The following was recorded during the observations: (i) number of visited flowers per plant, (ii) time of permanence on flowers, (iii) contact with anthers and stigmas, and (iv) collected resources (nectar and/or pollen).

The types of pollen carried by *A. mellifera* were evaluated on 25 individuals having pollen stored in their pollen baskets, collected directly from the flowers on June 25th, June 1st and July 25th, 2007, in three different hours (12:00 PM, 2:00 PM and 4:00 PM), with an entomological net, and individually stored in flasks containing ethyl acetate. In order to homogenize pollen grains stored in corbiculae, pollen loads from one among each individual's pollen baskets was diluted in alcohol 70%. Later, with one drop of these solutions, histological slides with glycerin/fuchsine gelatin (Louveaux *et al.*, 1978) were prepared and, under an optical microscope, 1,000 pollen grains from each sample were analyzed, assessing their *B. napus* pollen percentage.

Results

Anthesis and stigma receptivity

B. napus flowers (see Figure 1-6) remained open and vigorous for approximately three days and, according to the conditions presented during their development, they were characterized in five anthesis stages (as shown in Table 1 and see Figure 2-6).



Figures 1-6. *B. napus* flowers: (1) schematics of a flower's reproductive elements; (x) stigma, (filled circles) nectaries between the pair of long stamens, (empty circles) long stamens, (triangles) nectaries inside short stamens, (squares) short stamens. Anthesis stages: (2) first stage; (3) second stage (filled arrows show long stamens and empty arrows show short stamens); (4) third stage (dashed line shows the growing pistil with stigma under the stamens); (5) fourth stage (line shows growing pistil and stigma reaching stamen height); (6) fifth stage (white arrow points to the pistil, which is higher than the anthers).

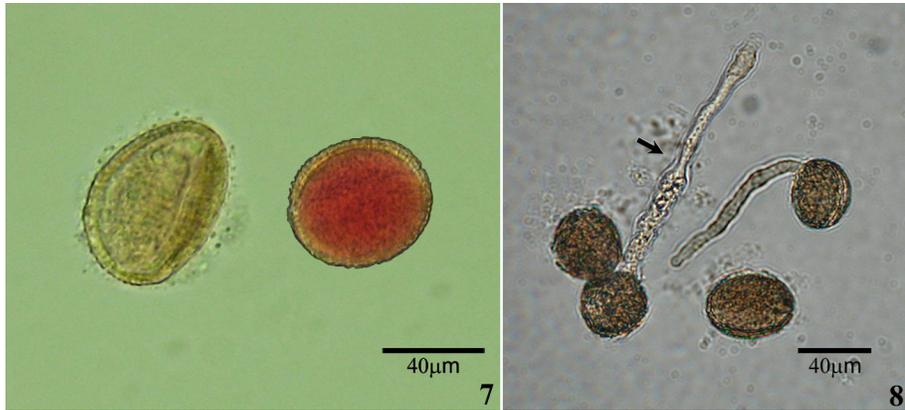
Table I. *B. napus* flower anthesis stages (cv. Hyola 432). PO= partially open; FO= fully open; BS= beginning of the senescence; S= senescence; F= falling; (+) receptive; (-) non-receptive.

Phase	Corolla	Pistil (mm) (x; sd)	Stigma	Long stamens (4)	Short stamens (2)	Pollen availability	Nectaries between long stamens	Nectaries between short stamens
1 st (12h)	PO	6.84; 0.30	-	Above the stigma, bent inwards	Below the stigma, bent outwards	High	Hidden	Accessible
2 nd (24h)	FO	6.84; 0.31	+	Above the stigma, bent outwards	Below the stigma, bent outwards	High	Partially hidden	Accessible
3 rd (48h)	BS	7.99; 0.46	+	Above the stigma, bent to the outwards	Below the stigma, bent outwards	High	Accessible	Accessible
4 th (72h)	S	8.25; 0.65	-	Same height as the stigma, bent outwards	Below the stigma, bent outwards	Low	Accessible	Accessible
5 th (96h)	F	10.73; 0.81	-	Below the stigma	Below the stigma	None	Accessible	Accessible

The dehiscence of anthers in the six stamens occurs during pre-anthesis. Thus, pollen availability is observed as soon as the flower opens (as shown in Table 1). The two short stamens release pollen grains under the stigma during the entire anthesis period and the four long stamens release the grains above it until the third stage, since the stigma reaches the stamens' height in the fourth stage. When the flower opens, the stigma is not yet receptive. The stigma presents itself receptive in the second and third stages of anthesis, period in which there is secretion on the stigmatic surface. When it ceases to be receptive, this secretion dries and causes the color to change from yellow to a dark beige. After the fourth stage of anthesis, the process of silique formation begins.

Pollen grain viability

Throughout this cultivar's anthesis, there was a visible decrease in pollen grain amounts, especially on stage 4 flowers (having 72 hours). From cytoplasmic content analyses (see Figure 7) and the germination potential (see Figure 8) of pollen grains, it was verified that the viability average percentage decreased from the first to the last hours of anthesis (Phase 2 to 4), especially in the first test. It was verified that the grains maintained some viability for as much as 72 hours (see Figure 9).



Figures 7-8. Pollen grains. (7) grains contrasted with acetic-carmin. (to the left, grain without cytoplasmic content, to the right, grain with cytoplasmic content); (8) grains in the culture medium (arrow indicates germinated pollen tube).

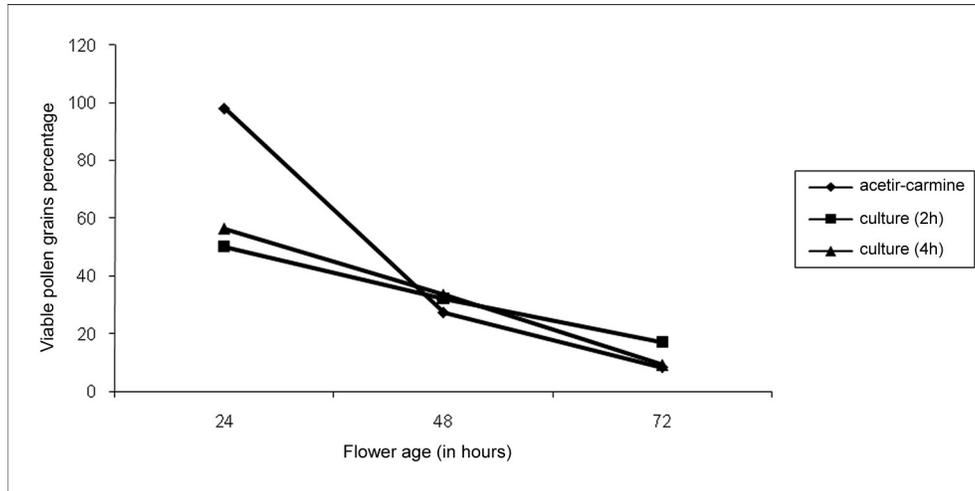


Figure 9. *B. napus* pollen grain viability percentage (cv. Hyola 432) according to flower age, in the three performed tests.

Interactions between bees and flowers

Throughout the *B. napus* florescence period, the plants presented between 1-15 open flowers ($\bar{x} = 5.04$; $sd = 2.45$) and the bees visited from 1-7 flowers/plant ($\bar{x} = 2.02$; $sd = 1.16$) during their foraging. Their time of permanence on one flower varied from 1 to 43 seconds ($\bar{x} = 3.29$; $sd = 2.36$), being that, on those which they stayed longer than 10 seconds, the behavior of discarding pollen adhered to the body was observed (1.2% of the records), which was performed by their hanging on flowers and shaking until the excess pollen was released.

When seeking food resources, these honey bees presented intense foraging activities on the flowers. They touched flowers' anthers and stigmas on every visit. Nectar was the most sought resource, being collected during all three evaluated periods. It was verified that the bees preferred collecting nectar from nectaries located in the inner part of short stamens, which were more easily accessible to them during the entire anthesis period.

The bees observed in flowers during the 2nd and/or 3rd period of anthesis, in the first observation period, sought both resources in the same flower and were active pollen collectors, being that the latter behavior was also observed in the remaining periods, although more sporadically (see Figure 10). During hours in which there was no active pollen collection, this resource was passively obtained during the bees' displacement on the flowers. However, throughout their entire flower visitation periods, the bees stored great amounts of pollen in their corbiculae.

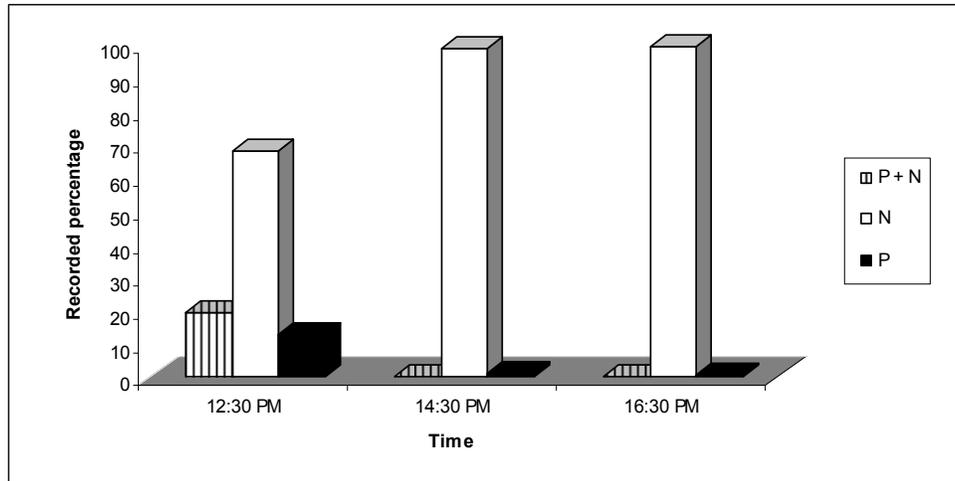


Figure 10. Resources collected by *A. mellifera* when visiting *B. napus* flowers (cv. Hyola 432). P= pollen; N= nectar.

The analysis of pollen loads stored in pollen baskets revealed that the bees exclusively carried *B. napus* pollen.

Discussion

Anthesis and stigma receptivity

The flowers' morphophysiological development evidenced that the probability of self-pollination in the two short stamens is limited, since they release pollen grains under the stigma during the entire anthesis period. Concerning the four long stamens, self-pollination is only likely in the first stage of anthesis, since the stamens are above the stigma and bent inwards. However, at this point, the structure is not receptive. The stigma presents this condition in the second and third stages, periods in which the four long stamens are above it and bent outwards. Thus, coinciding with the high availability of pollen, flower morphology favors cross-pollination. This result indicates that, the action of pollinator agents is required during these two phases. Cross-pollination might be made by bees seeking of food resources on the flowers, or through pollen spread by the wind

(Timmons *et al.* 1995). The possibility of pollination became nonviable as of the fourth stage of anthesis, as the stigma became unreceptive. These results are evidences of the occurrence of protandria in *B. napus* flowers (cv. Hyola 432).

Diverging results were found in tests developed by Mussury and Fernandes (2000) in the municipality of Dourados, Brazil, with cultivar CTC-4, and by Delaplane and Mayer (2000), in Georgia, USA, in which they concluded that, when the flower opens, its stigma is already receptive but the anthers are not yet dehiscent, verifying protogyny in the flowers. These two authors state that, within the studied cultivars, anther dehiscence occurs after the complete opening of the flower. Thus, until then, the flowers are only susceptible to cross-pollination, being that they only become susceptible to self-pollination during the complete opening of the flower.

Results obtained in this study, with Hyola 432 flowers, seem to agree with Abrol (2007), who concluded that the majority of *Brassica* species are self-incompatible to a certain point, but that this fact varies depending on the species, cultivar and plant age. Limitations to the occurrence of self-pollination were verified in all anthesis stages regarding the evaluated Hyola 432 flowers. Thus, the greater probability of cross-pollination, by *A. mellifera* and other pollinator insects, enables a greater genetic variability for these cultivars.

Pollen grain viability

The decrease in the amount of pollen grains, especially on stage 4 flowers, might be attributed to the senescence process, as well as to intense bee visitations while seeking food resources.

Similar results were verified by Bots and Mariani (2005), who verified some viability for 72 hours at most, from which a decrease of 35% in the average percentage of pollen grain germination was observed in young flowers (with dehiscent anthers and partially open corollas) and 15% in senescent flowers (after 72 hours).

According to Ockendon and Gates (1976) there is some difficulty in measuring pollen grain fertility and the available methods tend to overestimate its viability. According to these authors, the acetic-carmin method demonstrates that pollen which does not contain cytoplasm is certainly sterile, while pollen containing cytoplasm is not necessarily fertile. Thus, more accurate tests may present higher effectiveness and reveal lower averages, as do grain germination tests. This tendency was confirmed in this study, given that the germination index was approximately 50% lower in germination tests, when comparing the presence of cytoplasmic content. Honey bees tend to visit younger flowers (with dehiscent anthers and partially open corolla) more regularly than senescent flowers (Bots and Mariani, 2005), presenting, thus, a higher probability of viability for their transported pollen grains, since the highest viability percentages occur during the first hours of anthesis. Hence, it is suggested that these insects make an efficient pollination in *B. napus* flowers.

Interactions between bees and flowers

A. mellifera visited a small number of flowers per plant and spent little time on each flower, which differs from what was observed by Adegas and Nogueira-Couto (1992), who registered longer foraging periods on flowers. This behavioral difference might be attributed to the amount of flower resources offered to the pollinators, which probably varies according to the cultivar. Indeed, the reduced volume of nectar in the studied cultivar flowers, lower than 1µl, made its collection impossible. This behavior, observed in *A.*

mellifera, seems to concur with a study developed by Cresswell (1999), who, while handling different amounts of nectar, concluded that visiting periods of *Bombus lapidarius* on flowers increased when levels of nectar were higher.

Bees that stayed longer than 10 seconds on flowers presented the behavior of discarding pollen grains attached to their body. According to Thorp (2000) sometimes the bees' bodies become overloaded while moving amongst flowers due to passive pollen collection. The author states that, in such cases, these insects present the behavior of discarding the excess pollen, so they may become lighter in order to perform flight activities. Williams (1980) verified the same discarding behavior. Concerning the bees observed on *Hyola 432* flowers, this discarded pollen represents a small percentage, therefore, their visits to a small number of flowers/plant, their brief permanence on flowers and their contact with anthers and stigmas favor cross-pollination.

The bees touched flower anthers and stigmas in all visits, favoring cross-pollination; this happens because their body size is compatible to the flowers' size, as well as to its landing behavior and displacement on the flower. Since these insects insert their heads into the flower in order to suck nectar, body hairs touch the anthers and adhere to pollen grains. When they fly to another flower, the grains detach and fall on the stigma, which favors cross-pollination.

The bees' preference for nectar collection coincides with results obtained by Williams (1980); Adegas and Nogueira-Couto (1992); Free and Nuttal (1968), in which they verified the active collection of this resource throughout the day. The results of this study are reinforced by Williams (1980), who states that the bees take more benefit from inner nectaries, because they are not only more easily accessible but also secrete a larger amount of nectar and have a higher sugar concentrations. In addition, they also reinforce

low percentages of active pollen collections, stating that the bees never sought this resource, exclusively, while foraging on *B. napus* crops. According to Malerbo-Souza *et al.* (2008) the highest frequency of nectar collection compared to pollen collection is directly related to the insects' high energetic demands during their foraging, once this resource's carbohydrates stimulate their flying activity.

The composition of bee pollen loads is essential in order to verify their foraging habits and, after analyzing pollen contents from their pollen baskets, we could infer their efficiencies as pollinators of certain plant species (Wittmann and Schlindwein, 1995). The constancy of *A. mellifera* on the target-species, *B. napus*, might be justified by the abundance of nectar and pollen throughout the day.

The foraging behavior of honey bees, characterized by their visits to a small number of flowers/plant, their brief time of permanence on flowers and their contact with anthers and stigmas, along with their floral constancy, allows us to consider them as potential *B. napus* pollinators.

Acknowledgements

We would like to thank professors Marcos Garrafa, Valdir Benedetti and Dalziro Valdameri for allowing the execution of field works at SETREM; professor Leandro Vieira Astarita for aiding during the preparation of materials for pollen analysis; Lucas Lima Fontana for image editing; Ione Maria de Souza Rosa and Andressa Paladini for helping out during field data gathering; Maria Isabel Behs de Araújo for reviewing the manuscript; CNPq (National Council for Scientific and Technologic Development) for granting a master's scholarship (Programa de Pós Graduação em Zoologia, PUCRS) to the first author (Proc. 131357/2007-7); and PUCRS for making its facilities available for the execution of this research project.

References

- ABROL, DP., 2007. Honeybees rapeseed pollinator plant interaction. Adv. Bot. Res., vol. 45, p. 337-369.
- ADEGAS, JEB. and NOGUEIRA-COUTO, RH., 1992. Entomophilous pollination in rape (*Brassica napus* L. var *oleifera*) in Brazil. Apidol., vol. 23, p. 203-209.
- ALBUQUERQUE, GA., 2006. *Avaliação Reológica e Caracterização Físico-Química do Biodiesel de Canola e Misturas*. [July, 2008]. Available at:
<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congressso2006/Armazenamento/AvaliacaoReologica3.pdf>
- ALBUQUERQUE, GA., SOUZA, MA., ANDEIA, RA., DANTAS, MB., SILVA, MCD., SANTOS, IMG. and SOUZA, AG., 2007. *Compatibilidade Térmica dos Biodieseis da Canola, Milho, Soja e Misturas – Uma Avaliação Termogravimétrica*. [September, 2008]. Disponível online em:
<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/caracterizacao/15.pdf>
- BARNI, ND., HILGERT, ER., ZANOTELLI, V., VARGAS, JNR., TEDESCO, A., BOHN, D., GOMES, JES. and GONÇALVES, JC., 1985. Introdução e avaliação de cultivares de colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzg.) no Estado do Rio Grande do Sul. Agron. Sulriog., vol. 21, p. 21-54.
- BOTS, M. and MARIANI, M., 2005. *Pollen viability in the field*. [May, 2008]. Available at: www.cogem.net/ContentFiles/Pollen_viability.pdf
- CORBET, SA., WILLIAMS, IH. and OSBORNE, JL., 1991. Bees and the pollination of crops and wild flowers in the European Community. Bee Wld., vol. 72, p. 47–59.

CRESSWELL, JE., 1999. The influence of nectar and pollen availability on pollen transfer by individual flowers of oil-seed rape (*Brassica napus*) when pollinated by bumblebees (*Bombus lapidarius*). J. Ecol., vol. 87, no. 4, p. 670-677.

CUNHA, GR., 2007. *Agroenergia – O futuro que chegou*. Passo Fundo: O Nacional. 52p.

DAFNI, A., KEVAN, PG. and HUSBAND, BC., 2005. *Practical Pollination Biology*. Canada: Enviroquest, Ltd. 590 p.

D'ÁVILA, M. and MARCHINI, LC., 2005. Polinização realizada por abelhas em culturas de importância econômica no Brasil. Bol. Ind. Anim., vol. 62, no. 1, p. 79-90.

DELAPLANE, KS. and MAYER, DF., 2000. *Crop Pollination by bees*. USA: CABI Publishing. 344p.

EARDLEY, C., ROTH, D., CLARKE, J., BUCHMANN, S. and GEMMILL, B., 2006. *Pollinators and Pollination: A resource book for policy and practice*. Africa: African Pollinator Initiative. 77p.

EISIKOWITCH, D., 1981. Some aspects of pollination of oil seed rape (*Brassica napus* L.). J. Agric. Sci., vol. 96, p. 321-326.

FAEGRI, K. and PIJL, VD., 1979. *The principles of pollination ecology*. Oxford: Pergamon Press. 244p.

FLORES, LRF. and TRINDADE, JLF., 2007. *Importância da polinização entomófila em diferentes culturas de interesse econômico para o Brasil*. [Outubro, 2008]. Available at: http://www.pg.cefetpr.br/setal/docs/artigos/2007/polinizacao_entomofila.pdf

FREE, JB., 1993. *Insect pollination of crops*. London: Academic Press. 684p.

FREE, JB. and NUTTALL, PM., 1968. The pollination of oilseed rape (*Brassica napus*) and the behaviour of bees on the crop. J. Agric. Sci., vol. 71, p. 91-94.

FREITAS, BM. and PAXTON, RJ., 1996. The role of wind and insects in cashew (*Anacardium occidentale*) pollination in NE Brazil. J. Agric. Sci., vol. 126, p. 319-326.

GENE TECHNOLOGY REGULATOR, 2002. *The biology and ecology of canola* (*Brassica napus*). [March, 2008]. Available at: <http://www.ogtr.gov.au/pdf/ir/brassica.pdf>

IMPERATRIZ-FONSECA, VL., 2004. *Serviços aos ecossistemas, com ênfase nos polinizadores e polinização*. [May, 2008]. Available at: http://www.ib.usp.br/vinces/logo/servicos%20aos%20ecossistemas_polinizadores_vera.pdf

KEVAN, G. and ESIKOWITCH, D., 1990. The effects of insect pollination on canola (*Brassica napus* L. cv. O. A. C. Triton) of seed germination. Euphytica, vol. 45, p. 39-41.

LOUVEAUX, J., MAURIZIO, A. and VORWHL, G., 1978. Methods of melissopalynology. Bee Wld., vol. 59, no. 4, p. 139-157.

MALERBO-SOUZA, DT., TOLEDO, VAA. and PINTO, AS., 2008. *Ecologia da Polinização*. São Paulo: Editora CP 2. 31p.

MASIEROWSKA, ML., 2003. Floral nectaries and nectar production in brown mustard (*Brassica juncea*) and white mustard (*Sinapis alba*) (Brassicaceae). Plant Syst. Evol., vol. 238, p. 97-107.

MCGREGOR, SE., 1976. *Insect pollination of cultivated crop plants*. Washington: USDA. 411p.

MESQUIDA, J., MARILLEAU, R. and PHAM-DELEGUE, M., 1988. A study of rapeseed (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzger) flower nectar secretions. Apidol., vol. 19, no. 3, p. 307-318.

MUSSURY, RM. and FERNANDES, W., 2000. Studies of the Floral Biology and Reproductive System of *Brassica napus* L. (Cruciferae). Braz. Arch. Biol. Technol., vol. 43, no. 1, p. 111-117.

- OCKENDON, DJ. and GATES, PJ., 1976. Reduced pollen viability in the onion (*Allium cepa*). New Phytol., vol. 76, p. 511-517.
- SABBAHI, R., OLIVEIRA, D. and MARCEAU, J., 2005. Influence of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Density on the Production of Canola (Cruciferae: Brassicaceae). J. Econ. Entomol., vol. 98, no. 2, p. 367-372.
- SCHLINDWEIN, C., WITTMANN, D., MARTINS, CF., HAMM, A., SIQUEIRA, JA., SCHIFFLER, D. and MACHADO, C., 2005. Pollination of *Campanula rapunculus* L. (Campanulaceae): How much pollen flows into pollination and into reproduction of oligolectic pollinators? Plant Syst. Evol., vol 250, p. 147-156.
- SYAFARUDDIN, HORISAKI, A., NIKURA, S., YOSHIOKA, Y. and OHSAWA, R., 2006. Effect of floral morphology on pollination in *Brassica rapa* L. Euphytica, vol. 149, p. 267-272.
- THORP, RW., 2000. The collection of pollen by bees. Plant Syst. Evol., vol. 222, p. 211-223.
- TIMMONS, AM., O'BRIEN, ET., CHARTERS, YM., DUBBELS, SJ. and WILKINSON, MJ., 1995. Assessing the risks of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus* ssp. *oleifera*. Euphytica, vol 85, p. 417-423
- TOMM, GO., 2005. *Situação em 2005 e perspectivas da cultura de canola no Brasil e em países vizinhos*. [March, 2008]. Available at:
http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp26.htm
- WILLIAMS, IH., 1978. The pollination requirements of swede rape (*Brassica napus* L.) and turnip rape (*Brassica campestris* L.). J. Agric. Sci., vol. 91, p. 343-348.
- WILLIAMS, IH., 1980. Oilseed rape and beekeeping particularly in Britain. Bee Wld., vol. 61, p. 141-153.

WITTMANN, D. and SCHLINDWEIN, D., 1995. Melittophilous plants, their pollen and flower visiting bees in southern Brazil. 1. Losaceae. Bioc., vol. 3, no. 2, p. 19-34.

CAPÍTULO 2

1 **Qual a contribuição potencial de abelhas melíferas na polinização de canola no sul do** 2 **Brasil?**

3 Annelise de Souza Rosa⁽¹⁾, Betina Blochtein⁽¹⁾ e Diego Kweco Lima⁽¹⁾

4 (1) Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências, Av.
5 Ipiranga 6681, CEP 90619-900. Porto Alegre, RS. E-mail: annesouzar@gmail.com,
6 betinabl@puers.br, kwecko85@hotmail.com

7 Resumo – A canola é considerada autocompatível, entretanto, estudos indicam aumento na
8 produtividade da cultura resultante da polinização efetuada por *Apis mellifera* L.
9 Considerando-se a crescente importância dessa cultura no Rio Grande do Sul avaliou-se o
10 incremento da produtividade de siliquis e sementes a partir de interações com insetos
11 antófilos e com testes de polinização manual. A frequência de visitas de *A. mellifera* foi
12 relacionada com o desenvolvimento da floração da cultura e a produtividade foi comparada
13 entre plantas visitadas por insetos, polinizadas manualmente (geitonogamia e xenogamia) e
14 com ausência de indução de polinização. Em cada tratamento avaliou-se a produtividade de
15 siliquis e de sementes formadas por planta. Dentre os 8624 insetos visitantes florais
16 registrados destacaram-se representantes de Hymenoptera (92,35%), dos quais 99,83%
17 eram *A. mellifera*. A relação entre essas abelhas e o curso da floração foi significativamente
18 positiva ($r= 0,87$; $P= 0,002$). A indução de polinização elevou a produtividade de sementes
19 de 28,36% (autogamia) para 50,45% com livre visita de insetos e com polinização manual,
20 respectivamente, para 48,75 (geitonogamia) e 55,12% (xenogamia). Infere-se que a
21 produtividade de canola ainda pode ser aumentada com o acréscimo e o manejo dirigido de
22 abelhas na cultura durante o período de floração.

23 Termos para indexação: *Apis mellifera*, *Brassica napus*, insetos visitantes florais, floração,
24 produtividade agrícola, sementes.

25 **What is the potential honeybees contribution on canola pollination in South Brazil?**

26 Abstract – Canola is considered to be self-compatible, however, studies indicate an increase
27 in productivity of the culture resulting from pollination carried out by *Apis mellifera* L.
28 Considering the increasing importance of this culture in Rio Grande do Sul it was evaluated
29 the rise of productivity of siliquas and seeds from interactions with visitors flower insects
30 and with handly pollination. The frequency of *A. mellifera* visits was related to the
31 development of culture flowering and the productivity was compared among plants visited
32 by insects, handly pollinated (geitonogamy and xenogamy) and with the absence of
33 induction of pollination. In each treatment was evaluated the productivity of siliquas and
34 the seeds formed by plant. Among the 8624 flower visitors insects registered, Hymenoptera
35 representatives stood out (92.35%) from which 99.83% were *A. mellifera*. The relation
36 among these bees and the course of flowering was significantly positive ($r= 0,87$; $P=$
37 $0,002$). The induction of pollination increased the seeds productivity from 28,36%
38 (autogamy) to 50,45% with free insects visit and with handly pollination, respectively, to
39 48,75 (geitonogamy) and 55,12% (xenogamy). It is inferred that canola's productivity can
40 still be increased with the addition and the management of bees in the culture during
41 flowering period.

42 Index terms: Agroproductivity, *Apis mellifera*, *Brassica napus*, floral visitors insects,
43 flowering, seeds.

44

45

46

Introdução

47

48 *Brassica napus*, popularmente conhecida como canola, é uma seleção
49 geneticamente modificada da colza. Mundialmente, é a terceira planta oleaginosa mais
50 produzida e seu maior consumo ocorre nos países desenvolvidos (Canola Council of
51 Canada, 1999; Tomm, 2005). Essa Brassicaceae integra os sistemas de produção de grãos
52 no sul do Brasil (Barni et al., 1985; Tomm, 2007), onde destaca-se como excelente
53 alternativa econômica, pois além da produção de óleo para o consumo humano, a canola
54 também é apropriada à produção de biodiesel (Cunha, 2007; Tomm, 2007; Marjanovic-
55 Jeromela et al., 2008).

56

Klein et al. (2007) ressaltam a importância da polinização realizada por insetos para
57 a produção de frutos e sementes. A polinização efetuada por abelhas, além de contribuir
58 para a preservação dos ecossistemas naturais é uma das melhores alternativas para o
59 aumento da produtividade de culturas (Westcott & Nelson, 2001; D'Ávila & Marchini,
60 2005) e conservação de sua viabilidade gênica (Eardley et al., 2006). Neste contexto
61 inserem-se as abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.), consideradas como principais visitantes
62 florais (Delaplane & Mayer, 2000) e eficientes polinizadoras de *B. napus* (Free, 1993;
63 Sabbahi et al., 2005). Esses insetos representaram aproximadamente 64% dos visitantes
64 florais da cultura na Geórgia, EUA (Delaplane & Mayer, 2000) e 81% em São Paulo, Brasil
65 (Adegas & Nogueira-Couto, 1992). A eficiência polinizadora dos insetos antófilos está
66 intimamente relacionada à biologia floral da espécie vegetal e ao seu comportamento de
67 forrageio (Flores & Trindade, 2007; Gullan & Craston, 2008). Além disso, as abelhas
68 melíferas possuem o corpo a transferência de grande número de grãos de pólen de espécies
69 de *Brassica* (Abrol, 2007).

70 Embora a canola seja considerada uma cultura autocompatível, a presença de insetos
71 polinizadores, especialmente *A. mellifera*, aumenta sua produtividade (Eisikowitch, 1981;
72 Kevan & Eisikowitch, 1990; Delaplane & Mayer, 2000; Westcott & Nelson, 2001). Uma
73 adequada polinização, resultante de visitas consecutivas de abelhas, assegura o processo
74 reprodutivo das brassicáceas elevando significativamente seus índices de produtividade
75 (Abrol, 2007). Entretanto, estudos destacam que os efeitos do incremento na produtividade
76 de sementes de *B. napus*, por meio da polinização realizada por insetos, além de outros
77 atributos, dependem da cultivar, das condições ambientais e da capacidade compensatória
78 da cultura (Mesquida et al., 1988; Free, 1993). Mussury & Fernandes (2000) constataram
79 aumento de 31,88% no número de sementes formadas por planta sob condições naturais de
80 polinização em relação à autogamia. Com relação ao peso médio de sementes, Williams et
81 al. (1986) e Adegas & Nogueira-Couto (1992) constataram, respectivamente, aumento de
82 37,47% e 19,24% na produtividade de plantas com visitas de abelhas quando comparadas a
83 outras com exclusão de insetos. Com a introdução de 3 a 4 colônias por hectare, em
84 comparação a áreas com ausência de insetos, Sabbahi et al. (2005) e Abrol (2007)
85 registraram, respectivamente, 46% e 36,2% de aumento no peso das sementes. A presença
86 dessas abelhas nos cultivos de canola podem ainda contribuir para o aumento da taxa de
87 germinação das sementes, como evidenciado por Kevan & Eisikowitch (1990) no Canadá.

88 Considerando-se a necessidade mundial de aumento na produção de sementes e a
89 crescente importância de *B. napus* no Rio Grande do Sul, avaliou-se a produtividade de
90 síliquas e sementes resultante da interação de abelhas domésticas com flores e da
91 polinização manual sobre as flores.

Material e Métodos

92

93 O estudo abrangeu desde o período da pré-floração até a colheita das siliquis de *B.*
94 *napus*, cultivar Hyola 432, e foi implantado em 13 ha da cultura, em uma área agrícola
95 pertencente à Sociedade Educacional Três de Maio (27°46'24''S 54°14'24'O), no
96 município de Três de Maio, RS, Brasil. Na região, onde as áreas para a manutenção de
97 abelhas silvestres eram reduzidas, haviam dois apiários com 20 e 18 colônias,
98 respectivamente, a cerca de 0,2 km e 1 km da borda da lavoura.

99 A coleta de dados foi realizada entre os meses de julho a outubro de 2007, período
100 no qual, nesta região de clima temperado, as médias de temperatura atingiram 14,6°C e a
101 precipitação e a umidade relativa do ar foram de 2,8mm e 74,6%, segundo informações
102 meteorológicas do Banco de Dados do Centro de Meteorologia Aplicada da Fundação
103 Estadual de Pesquisa e Agropecuária (FEPAGRO).

104 Os registros de *A. mellifera* e outros insetos foram realizados ao longo do período de
105 floração a fim de verificar quais os mais freqüentes e aqueles de ocorrência esporádica.
106 Esse procedimento foi realizado em três períodos de 30 minutos (a partir das 12h, 14h e
107 16h), duas vezes por semana, em condições de temperaturas superiores a 12°C, totalizando
108 27 horas de registros. Para tanto, percorreu-se um transecto de 300 metros, a uma
109 velocidade média de cerca de 600m/h. A contagem dos insetos foi realizada em nível de
110 Ordem, exceto para *A. mellifera* que foi identificada em nível de espécie.

111 O florescimento foi acompanhado utilizando-se 120 plantas, marcadas com fitas
112 coloridas, distribuídas nas extremidades (4 pontos) e no interior da lavoura (8 pontos). Para
113 acompanhar a progressão da floração, o número de flores na inflorescência principal de
114 cada planta foi avaliado durante todo o período de florescimento.

115 No teste de eficiência da polinização, foi comparada a produtividade de sementes
116 em quatro experimentos: (a) autogamia, cobrindo-se as inflorescências durante todo o
117 período de antese (ausência de insetos); (b) controle, com acesso espontâneo dos insetos;
118 (c) geitonogamia (ausência de insetos - polinização manual entre flores da mesma planta);
119 (d) xenogamia (ausência de insetos - polinização manual entre flores de plantas distintas).
120 Para cada tratamento, foram realizadas 4 repetições, com 7 plantas em cada uma delas. Para
121 a avaliação dos tratamentos de autogamia, geitonogamia e xenogamia, as plantas foram
122 protegidas com armações de madeira (1m x 1m x 1,80), cobertas com tecido de malha fina,
123 impedindo o acesso dos insetos às flores. O tratamento controle foi marcado com estacas
124 de madeira sem qualquer proteção, uma vez que era permitida a livre visitação de insetos.
125 Para a realização da polinização manual, os grãos de pólen foram transferidos entre as
126 flores vigorosas, utilizando-se pincel de ponta fina, em intervalos de quatro dias.
127 Considerando-se que nos dias com ausência de tratamento de polinização determinado
128 número de flores desenvolveu-se e ultrapassou o período vigoroso, calculou-se o índice de
129 flores tratadas com polinização manual, a partir da totalidade de flores produzidas, tendo
130 sido de respectivamente 51,91% e 42,57% nos tratamentos de geitonogamia e xenogamia.
131 Ao final do ciclo da cultura, as plantas foram colhidas e avaliados os parâmetros (1)
132 número total de siliquas produzidas/ planta (n=28 plantas/ tratamento; (2) número de
133 sementes/ síliqua (n=160 síliquas/ tratamento); (3) peso das síliquas (n=160 síliquas/
134 tratamento) e (4) peso das sementes (n=160 síliquas/ tratamento).

135 Para estimar o índice de óvulos desenvolvidos por planta (%), em cada um dos
136 tratamentos, verificou-se o número médio de flores e o número médio de óvulos por planta,
137 em 100 flores com ovários maduros. O peso das sementes por planta foi obtido

138 considerando-se o peso médio de uma semente e o número de sementes formadas por
139 planta.

140 A fim de estimar o número de grãos de pólen necessário a ser depositado sobre o
141 estigma para que ocorra a plena fertilização dos óvulos, contou-se o número médio de
142 óvulos em 100 flores com ovário maduro.

143 **Análise estatística**

144 A fim de averiguar a atratividade das flores às abelhas, verificou-se a relação entre a
145 frequência de *A. mellifera* e a progressão da floração de *B. napus* por meio do teste de
146 correlação de Pearson.

147 Para a comparação entre as médias dos parâmetros 1, 2, 3 e 4 nos diferentes
148 tratamentos de polinização foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste
149 de Games-Howell (com intervalo de confiança de 95%) para amostras não homogêneas
150 (número de siliquas/ planta, peso das siliquas e peso das sementes). O parâmetro número de
151 sementes/ síliqua apresentou dados não-paramétricos. Neste caso, para a comparação entre
152 as médias, foi utilizado o teste Kruskall-Wallis seguido pelo teste Student – Newman –
153 Keuls (com intervalo de confiança de 95%).

154 Em todas as análises utilizou-se o pacote estatístico SPSS, versão 11.5 para MS
155 Windows, com exceção do teste Student – Newman – Keuls que foi aplicado ao programa
156 Bioestat versão 5.0.

157 **Resultados e Discussão**

158 Ao longo da floração de *B. napus* foram registrados 8624 insetos visitando suas
159 flores. Dentre eles, foram encontrados representantes de Hymenoptera, destacando-se *A.*
160 *mellifera* com 99,83% do total dos registros, além de Diptera, Lepidoptera e Coleoptera

161 (Tabela 1). A atratividade das flores de *B. napus*, indicada pela frequência de *A. mellifera*,
 162 está associada à oferta de recursos alimentares, tanto de néctar quanto de pólen, conforme
 163 registros anteriores de Free (1993), Delaplane & Mayer (2000) e Mussury et al. (2003).
 164 Outro fator relacionado à intensa procura das abelhas pelas flores é o fato de *B. napus* ser
 165 uma cultura de inverno e nesse período haver escassez de fontes de alimento para insetos
 166 antófilos.

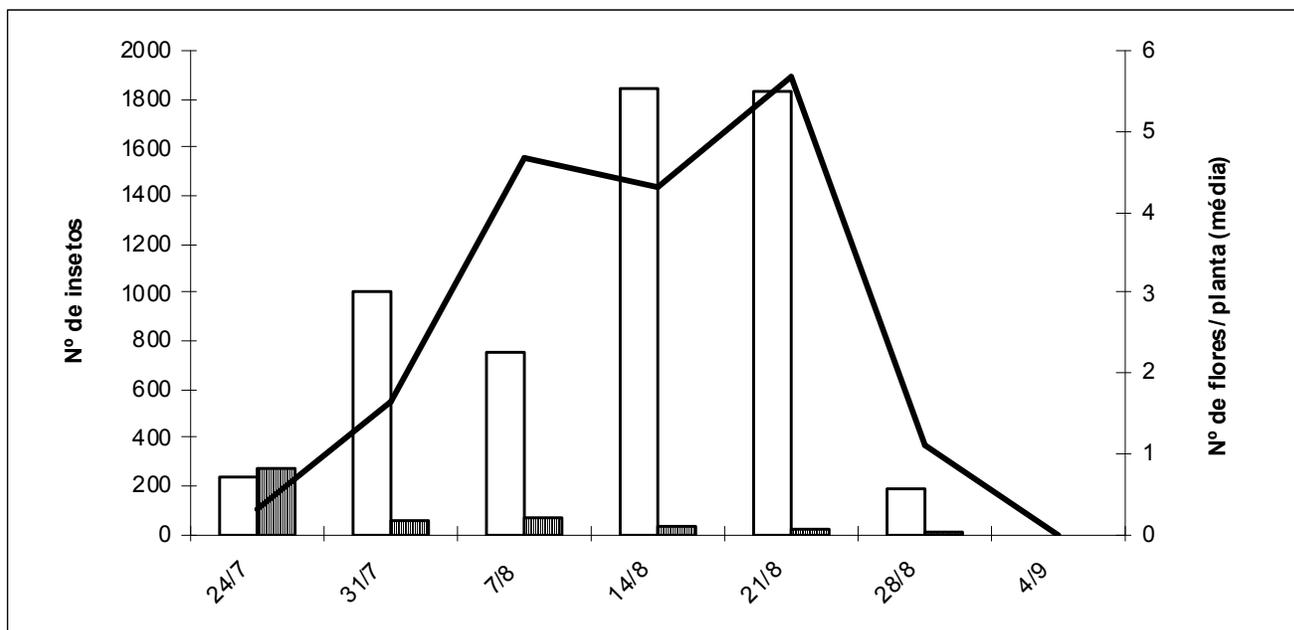
167

168 **Tabela 1.** Insetos visitantes florais registrados ao longo das linhas de cultivo, nos diferentes
 169 horários, durante a floração de *B. napus*.

Táxon	12:00h (%)	14:00h (%)	16:00h (%)
<i>Apis mellifera</i>	92,6	87,9	96,36
Outros himenópteros	0,19	0,03	0,23
Diptera	6,89	11,34	3,39
Lepidoptera	0,23	0,68	0,06
Coleoptera	0,07	0,03	0

170

171 Além do elevado índice de *A. mellifera* na lavoura, relativamente aos demais grupos
 172 de insetos visitantes florais, sua frequência esteve diretamente relacionada à progressão da
 173 floração de *B. napus*, diferentemente dos demais grupos de insetos registrados (Fig. 1). A
 174 correlação entre a quantidade de flores de *B. napus* na lavoura e o número de abelhas
 175 melíferas registradas no período de floração foi significativamente positiva (n= 9 dias; r=
 176 0,87; P= 0,002). A abundante oferta de recursos alimentares de *B. napus* para as abelhas
 177 durante esse período incrementa a atratividade das flores e, conseqüentemente a atividade
 178 polinizadora das abelhas que resulta em aumento na produtividade de sementes (Manning
 179 & Boland, 2000).



180

181 **Figura 1.** Frequência de insetos de acordo com a progressão da floração de *B. napus*. Barras sem
 182 preenchimento correspondem à *A. mellifera*; barras preenchidas correspondem a outros insetos; linha
 183 corresponde à progressão da floração.

184 Para Abrol (2007), a introdução de colônias de *A. mellifera* nessa cultura é uma
 185 alternativa para a elevação da produtividade e deve ser realizada quando,
 186 aproximadamente, 10% da floração estiver em evidência. O mesmo autor afirma que, se as
 187 colméias forem colocadas antes desse período, as abelhas podem ser conduzidas ao
 188 forrageio em outras plantas que estiverem em floração e não resultar em acréscimo de
 189 polinização para a cultura. No caso da cultivar em estudo, Hyola 432, o índice de 10% de
 190 floração ocorreu entre a segunda e a terceira semanas de floração, período no qual seria
 191 indicada a introdução de colônias na lavoura.

192 A produtividade de *B. napus* Hyola 432, em todas as situações de indução de
 193 polinização, seja por insetos (controle) ou manual (geitonogamia e xenogamia) foi superior
 194 à condição de autogamia (Tabelas 2 e 3).

195 **Tabela 2.** Parâmetros de produtividade de siliquis e de sementes de *B. napus* avaliados estatisticamente.
 196 \pm Refere-se aos valores de erro padrão. ⁽¹⁾Média calculada com base no valor percentual de produtividade.
 197 ⁽²⁾Valores referentes aos postos médios, com utilização do teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste Student –
 198 Newman – Keuls ($p < 0,05$), para dados não-paramétricos. Letras seguidas das médias representam semelhança
 199 (letras iguais) ou diferença (letras diferentes) estatística. Letras seguidas das médias nas colunas relativas ao
 200 número de siliquis/ planta, peso das siliquis e peso das sementes, indicam semelhança (letras iguais) ou
 201 diferença (letras diferentes) pelo teste Games-Howell ($p < 0,05$).

Tratamentos	Percentual médio do número de siliquis/ planta (n= 28 plantas/ tratamento) ⁽¹⁾	Número de sementes/ síliqua (n= 160 siliquis/ tratamento) ⁽²⁾	Peso médio das síliquis (g) (n= 160 siliquis/ tratamento)	Peso médio das sementes/ síliqua (g) (n= 160 siliquis/ tratamento)
Controle	59,52 \pm 1,55b	390,53a	0,14 \pm 0,002a	0,07 \pm 0,001a
Xenogamia	70,64 \pm 2,18a	307,67b	0,12 \pm 0,003b	0,06 \pm 0,002b
Geitonogamia	65,59 \pm 1,56a	321,22b	0,12 \pm 0,003b	0,06 \pm 0,002b
Autogamia	43,88 \pm 2,61c	252,16c	0,10 \pm 0,003c	0,04 \pm 0,002c

203

204 **Tabela 3.** Produtividade de siliquis e de sementes de *B. napus* formadas por planta.

205 \pm Refere-se aos valores de desvio padrão.

Tratamentos	Número médio de flores/ planta (n= 28)	Número médio de síliquis/ planta (n= 28) (% de formação das síliquis)	Estimativa do número de óvulos/ planta	Estimativa do número de sementes/ planta (% óvulos desenvolvidos)	Estimativa do peso de sementes/ planta (g)
Controle	318,57 \pm 154,69	189,07 \pm 101,98	6836,51	3449,35 (50,45)	14,56
Xenogamia	409,96 \pm 206,59	291,87 \pm 67,57	8797,74	4890,65 (55,12)	19,88
Geitonogamia	438,1 \pm 189,69	286,51 \pm 79,30	9401,62	4583,97 (48,75)	18,34
Autogamia	306,75 \pm 134,44	128,46 \pm 60,54	6582,85	1867,49 (28,36)	5,66

206

207 O resultado da produtividade das plantas polinizadas manualmente, com
 208 geitonogamia e xenogamia, foi estatisticamente semelhante tanto no número de siliquis/
 209 planta e de sementes por síliqua, quanto no peso das siliquis e das sementes/ síliqua
 210 (Tabela 2). Nessas plantas o número de siliquis produzidas foi mais elevado do que nos
 211 demais tratamentos. Entretanto, nas plantas submetidas à livre visita de insetos (controle) o
 212 número de sementes/ síliqua e o peso das siliquis e das sementes/ síliqua resultaram em

213 médias mais elevadas do que nos demais tratamentos de polinização manual, sobretudo em
214 relação à autogamia. A menor produtividade no número de sementes/ síliqua e no peso das
215 síliquas e das sementes, resultante dos tratamentos de polinização manual, pode ser
216 atribuída à baixa receptividade do estigma em determinadas flores no momento da
217 polinização (Muthugapatti et al., 1993). Esta situação poderia ser justificada pelo fato do
218 estigma permanecer receptivo durante 2 dias (Free, 1993) e os intervalos entre os
219 procedimentos de polinização manual terem sido de quatro dias. Como somente flores
220 vigorosas foram tratadas manualmente é plausível que determinadas flores estivessem em
221 fase anterior a da receptividade. Em contrapartida, uma vez que os grãos de pólen tenham
222 sido depositados no estigma em período anterior ao de sua receptividade, Bots & Mariani
223 (2005) afirmam que com o decorrer do tempo, a viabilidade dos grãos de pólen decresce.
224 Dessa forma os grãos que ficaram depositados anteriormente à receptividade do estigma
225 sofreram decréscimo na sua viabilidade, afetando assim, a produção de sementes.

226 Ao longo da antese, foi registrada elevada taxa de visitação de insetos,
227 especialmente *A. mellifera*. Considerando-se a intensa pressão polinizadora, provavelmente
228 as flores receberam mais de uma visita durante todo o período de antese. Dessa maneira,
229 possivelmente no momento da receptividade do estigma, grãos de pólen foram aderidos a
230 essa estrutura por meio desses insetos. Contrariamente, as flores dos tratamentos de
231 polinização manual receberam grãos de pólen apenas uma vez. Para Kwak & Jennersten
232 (1991), na polinização manual, perdas na produção são atribuídas a quantidades
233 insuficientes de pólen depositadas sobre o estigma das flores. Abrol (2007) ressalta a
234 eficiência polinizadora de *A. mellifera*, pois o seu corpo possui adaptações morfológicas
235 favoráveis ao transporte e deposição de grandes quantidades de grãos de pólen em flores.
236 No caso de *B. napus* (cv. Hyola 432), evidencia-se a importância da atividade dos agentes

237 polinizadores diante da necessidade de aproximadamente 21,46 grãos de pólen (n= 100
238 flores com ovários maduros; sd= 2,89) a serem depositados no estigma para que ocorra
239 plena fertilização dos óvulos e desenvolvimento das sementes. Os procedimentos de
240 polinização manual adotados possivelmente não foram tão eficientes na deposição de grãos
241 de pólen no estigma das flores quanto às abelhas melíferas em suas visitas.

242 A produtividade de siliquis e de sementes, formadas nas plantas polinizadas
243 manualmente, sobretudo nos tratamentos com xenogamia, foi maior do que a dos demais
244 tratamentos em todos os parâmetros avaliados, com exceção de geitonogamia, cujo índice
245 de fertilização dos óvulos foi inferior em 1,7% em relação ao tratamento controle (tabela 2).
246 Resultados divergentes foram constatados por Mussury & Fernandes (2000) em trabalho
247 com a cultivar CTC-4 em Dourados (MS), em que a polinização sob livre visita de insetos
248 (controle) produziu maiores números de sementes por planta (51,53% e 77,87%) do que os
249 tratamentos manuais com geitonogamia e xenogamia, respectivamente. Sugere-se que essa
250 variação esteja relacionada às diferenças quanto ao desenvolvimento das siliquis entre as
251 cultivares, às metodologias utilizadas na a realização dos trabalhos e ainda às distintas
252 condições climáticas entre as regiões de estudo.

253 O índice de autofertilidade *B. napus* Hyola 432, resultante do teste de autogamia,
254 indicou o desenvolvimento de 28,36% dos óvulos em sementes. Entretanto, com os
255 resultados obtidos nos tratamentos realizados, seja sob livre visita de insetos ou por meio de
256 polinização manual, pode-se verificar que a indução de polinização elevou a produtividade,
257 atingindo até 55,12% de fertilização de óvulos, como no tratamento com xenogamia. A
258 partir destes resultados pode-se inferir que a produtividade de sementes pode ser aumentada
259 com o acréscimo de abelhas na cultura durante o período de floração, dado que o número e
260 o peso das sementes das plantas tratadas com xenogamia foram superiores aos das plantas

261 com livre visita de insetos. Destaca-se que um fator limitante para as atividades de
262 forrageio das abelhas e conseqüentemente do seu potencial polinizador foi determinado
263 pelas baixas temperaturas da área de estudo, onde os registros de abelhas em flores
264 iniciaram a partir das 12h, quando as temperaturas atingiam 12°C.

265 Diversos estudos indicam o número ideal de colônias de abelhas requeridas para o
266 aumento na produtividade de canola e as recomendações variam, entre outros fatores,
267 conforme o local, a cultivar, a densidade de plantas, o número de flores/ inflorescência de
268 cada planta, a duração da floração, a condição interna das colônias e o número de flores/
269 hectare (Abrol, 2007). O mesmo autor recomenda a introdução de três a quatro colônias por
270 hectare e Sabbahi et al. (2005) indicam a importância de, no mínimo 3 colônias por hectare
271 para se obter uma produtividade satisfatória. Abrol (2007) afirma que as colônias devem ser
272 dispostas conforme o seu raio de forrageio e assegura que quando essa distância ultrapassa
273 0,5 km, a atividade polinizadora decresce. Experimentos realizados por Manning & Boland
274 (2000) indicaram que o número de siliquas por planta de *B. napus* (cv. Karoo) diminuiu
275 quando a distância do apiário aumentou, atingindo uma perda de 16% das siliquas a uma
276 distância de 1 km do apiário.

277 Dois apiários localizados nos arredores da lavoura de canola em estudo possuíam 20
278 colônias de *A. mellifera* (0,2 km) e 18 estavam situadas em maior distância (1 km). Com
279 base na estimativa de que, para a obtenção de uma produtividade satisfatória é necessária a
280 introdução de no mínimo 3 colônias por hectare, estima-se que o número indicado para esse
281 incremento na lavoura de canola em estudo seja de 39 colônias, uma vez que a extensão da
282 lavoura era de 13 ha. Entretanto, as colônias que se encontravam no raio de forrageio
283 satisfatório totalizaram 20. Esse número deveria ser duplicado para que houvesse aumento

284 considerável na produtividade de síliquas e sementes de *B. napus*. De fato, o índice de
285 síliquas produzidas no experimento controle pode, potencialmente, ser aumentado em até
286 40,48%. Também o número de sementes pode ser elevado com o aumento da polinização,
287 dado que o número de óvulos abortados foi de 49,55%.

288

Conclusões

289

1. A indução manual de polinização eleva a taxa de produtividade de *B. napus*;

290

2. *Apis mellifera* é o inseto mais freqüente nas flores de *B. napus*;

291

3. *Apis mellifera* é o inseto polinizador indicado para o aumento da produtividade de siliquas e sementes de *B. napus*.

292

293

Agradecimentos

294

Agradeço ao Dr. Nídio Barni e ao Dr. Gilberto Tomm pelas sugestões sobre a

295

escolha da cultura e da área para o estudo e aos professores Marcos Garrafa, Valdir

296

Benedetti e Dalziro Valdameri pela permissão de uso da lavoura e suporte a realização dos

297

trabalhos de campo na Sociedade Educacional Três de Maio (SETREM). Agradeço também

298

ao Ney Telles Ferreira Júnior, Ione Maria de Souza Rosa, Andressa Paladini e Nadílson

299

Roberto Ferreira pelo auxílio nos trabalhos em campo, ao Professor Dr. João Feliz de

300

Moraes pelo auxílio nas análises estatísticas e à Daniela Loose Ferreira pelas sugestões na

301

revisão do manuscrito. Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado (Programa de Pós

302

Graduação em Zoologia, PUCRS) ao primeiro autor (Proc. 131357/2007-7) e à PUCRS

303

pela infra-estrutura que permitiu a realização dessa pesquisa.

304

305

306

307

308

309

310 **Referências**

- 311 ABROL, D.P. Honeybees rapeseed pollinator plant interaction. **Advances in Botanical**
312 **Research**, v. 45, p. 337-369. 2007.
- 313 ADEGAS, J.E.B.; NOGUEIRA-COUTO, R.H. Entomophilous pollination in rape
314 (*Brassica napus* L. var *oleifera*) in Brazil. **Apidologie**, v. 23, p. 203-209, 1992.
- 315 BARNI, N.D.; HILGERT, E.R.; ZANOTELLI, V.; VARGAS, J.N.R.; TEDESCO, A.;
316 BOHN, D.; GOMES, J.E.S.; GONÇALVES, J.C. Introdução e avaliação de cultivares de
317 colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzg.) no Estado do Rio Grande do Sul.
318 **Agronomia Sulriograndense**, v. 21,p. 21-54, 1985.
- 319 BOTS, M.; MARIANI, C. **Pollen viability in the field**. Radboud Universiteit Nijmegen:
320 2005. 51p. Disponível em: http://www.cogem.net/ContentFiles/Pollen_viability.pdf.
321 Acesso em: 08 Mai. 2007.
- 322 CANOLA COUNCIL OF CANADA. **Annual report**. Canadá: 2007. 16p. Disponível em:
323 <[http://www.canola-council.org/uploads/Canola%20Council%20of%20Canada%20](http://www.canola-council.org/uploads/Canola%20Council%20of%20Canada%20annual%20report%20-%202007.pdf)
324 [annual%20report%20-%202007.pdf](http://www.canola-council.org/uploads/Canola%20Council%20of%20Canada%20annual%20report%20-%202007.pdf)>. Acesso em: 16 Jan. 2009.
- 325 CUNHA, G.R. **Agroenergia – O futuro que chegou**. Passo Fundo, 2007. 52p.
- 326 D’AVILA, M.; MARCHINI, L.C. Polinização realizada por abelhas em culturas de
327 importância econômica no Brasil. **Boletim da Indústria Animal**, v. 62, p. 79-90, 2005.
- 328 DELAPLANE, K.S.; MAYER, D.F. **Crop Pollination by bees**. Cambridge, 2000. 344p.
- 329 EARDLEY, C.; ROTH, D.; CLARKE, J.;BUCHMANN, S.; GEMMIL, B. **Pollinators and**
330 **Pollination: A resource book for policy and practice**. Africa, 2006. 77p.
- 331 EISIKOWITCH, D. Some aspects of pollination of oil seed rape (*Brassica napus* L.).
332 **Journal of Agricultural Science**, v. 96, p. 321-326, 1981.

333 FLORES, L.R.F.; TRINDADE, J.L.F. **Importância da polinização entomófila em**
334 **diferentes culturas de interesse econômico para o Brasil.** Paraná: V Semana de
335 Tecnologia em Alimentos, 2007. 8p. Disponível em: <[http://www.pg.cefetpr.br](http://www.pg.cefetpr.br/setal/docs/artigos/2007/polinizacao_entomofila.pdf)
336 [/setal/docs/artigos/2007/polinizacao_entomofila.pdf](http://www.pg.cefetpr.br/setal/docs/artigos/2007/polinizacao_entomofila.pdf)>. Acesso em: 09. Out 2008.

337 FREE, J.B. **Insect pollination of crops**, London, 1993. 684p.

338 GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. 2008. **Os Insetos: Um Resumo de Entomologia.** São
339 Paulo, 2008. 456p.

340 KEVAN, G.; EISIKOWITCH, D., 1990. The effects of insect pollination on canola
341 (*Brassica napus* L. cv. O. A. C. Triton) of seed germination. **Euphytica**, v. 45, p. 39-41.

342 KLEIN, A.; VAISSIERE, B.E.; CANE, J.H., STEFFAN-DEWENTER, I.;
343 CUNNINGHAM, S.A.; KREMEN, C.; & TSCHARNTKE, T. Teja. Importance of
344 pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society**, v.
345 274, p. 303-313, 2007.

346 KWAK, M.M.; JENNERSTEN, O. Bumblebee visitation and seedset in *Melampyrum*
347 *pratense* and *Viscaria vulgaris*: heterospecific pollen limitation. **Oecologia**, v. 86, p. 99-
348 104, 1991.

349 MALERBO-SOUZA, D.T.; TOLEDO, V.A.A.; PINTO, A. S. **Ecologia da Polinização.**
350 São Paulo, 2008. 31p.

351 MANNING, W.G.; BOLAND, W.T. A preliminary investigation into honey bee (*Apis*
352 *mellifera*) pollination of canola (*Brassica napus* cv. Karoo) in Western Australia.
353 **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 40, p. 439-442, 2004.

354 MARJANOVIĆ–JEROMELA, A.; MARINKOVIĆ, R.; MIJIĆ, A.; ZDUNIĆ, Z.;
355 IVANOVSKA, S.; JANKULOVSKA, M. Correlation and Path Analysis of Quantitative

356 Traits in Winter Rapeseed (*Brassica napus* L.). **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v.
357 73, p. 13-18, 2008.

358 MESQUIDA, J.; MARILLEAU, J.; PHAM-DELEGUE, M. A study of rapeseed (*Brassica*
359 *napus* L. var. *oleifera* Metzger) flower nectar secretions. **Apidologie**, v. 19, p. 307-318,
360 1988.

361 MUSSURY, R.M.; FERNANDES, W. Studies of the Floral Biolgy and Reproductive
362 System of *Brassica napus* L. (Cruciferae). **Brazilian Archives of Biology and**
363 **Technology**, v. 43, p. 111-117, 2000.

364 MUSSURY, R.M.; FERNANDES, W.D.; SCALON, S.P.Q. Atividades de alguns insetos
365 em flores de *Brassica napus* L. em Dourados-MS e a interação com fatores climáticos.
366 **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p.382-388, 2003.

367 MUTHUGAPATTI, K.K.; THORSNESS, M.K.; RUNDLE, S.J.; GOLDBERG, M.L.;
368 NASRALLAH, J.B.; NASRALLAH, M.E. Ablation of papillar cell function in *Brassica*
369 flowers results in the loss of stigma receptivity to pollination. **The Plant Cell**, v. 5, p. 263-
370 275, 1993.

371 SABBAHI, R.; OLIVEIRA, D.; MARCEAU, J. Influence of Honey Bee (Hymenoptera:
372 Apidae) Density on the Production of Canola (Cruciferae: Brassicaceae). **Journal**
373 **Economic Entomology**, v. 98, p. 367-372, 2005.

374 TOMM, G.O. **Situação em 2005 e perspectivas da cultura de canola no Brasil e em**
375 **países vizinhos**. Passo Fundo: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2005. 12p.
376 Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp26.htm>. Acesso em: 11 Mar.
377 2008.

378 TOMM, G.O. **Indicativos tecnológicos para produção de canola no Rio Grande do Sul**.
379 Passo Fundo: Sistemas de produção online, 2007. 32p. Disponível em:

380 <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/canola/p_sp03_2007.pdf>. Acesso em: 15 Jan.
381 2009.

382 WESTCOTT, L.; NELSON, D. Canola pollination: An update. **Bee World**, v. 82, p. 115-
383 129, 2001.

384 WILLIAMS, I.; MARTIN, A.P.; WHITE, R.P. The pollinations requirements of oil-seed
385 rape (*Brassica napus* L.). **Journal of Agricultural Science**, v. 106, p. 27-30, 1986.

CONCLUSÕES GERAIS

O período com potencial polinizador entomófilo das flores de canola limita-se ao segundo e terceiro estágios da antese, pois o estigma encontra-se receptivo e as flores são atrativas à *Apis mellifera* tanto pela oferta de néctar quanto pela elevada disponibilidade de pólen.

A viabilidade dos grãos de pólen decresce a partir das primeiras horas de antese até, aproximadamente, 72 horas.

O comportamento de forrageio de *A. mellifera*, resultante do contato com anteras e estigma, na visita a poucas flores/ planta, na curta permanência sobre as flores e na plena constância floral, permite inferir que são eficientes agentes polinizadores.

A. mellifera é o inseto mais freqüente nas flores de canola e sua freqüência é positivamente relacionada com o curso da floração.

A indução de polinização de *Brassica napus* eleva significativamente a produtividade de síliquas e grãos.

A introdução e o manejo dirigido de colônias de *Apis mellifera* em lavoura de canola, durante o período de floração, eleva a produtividade de sementes.

ANEXOS

Normas: Brazilian Journal of Biology

Preparação de originais

O trabalho a ser considerado para publicação deve obedecer às seguintes recomendações gerais:

Ser digitado e impresso em um só lado do papel tipo A4 e em espaço duplo com uma margem de 3 cm à esquerda e 2 cm à direita, sem preocupação de que as linhas terminem alinhadas e sem dividir palavras no final da linha. Palavras a serem impressas em itálico podem ser sublinhadas.

O título deve dar uma idéia precisa do conteúdo e ser o mais curto possível. Um título abreviado deve ser fornecido para impressão nas cabeças de página.

Nomes dos autores – As indicações Júnior, Filho, Neto, Sobrinho etc. devem ser sempre antecedidas por um hífen. Exemplo: J. Pereira-Neto. Usar também hífen para nomes compostos (exemplos: C. Azevedo-Ramos, M. L. López-Rulf). Os nomes dos autores devem constar sempre na sua ordem correta, sem inversões. Não usar nunca, como autor ou co-autor nomes como Pereira-Neto J. Usar *e, y, and, et* em vez de & para ligar o último co-autor aos antecedentes.

Os trabalhos devem ser redigidos de forma concisa, com a exatidão e a clareza necessárias para sua fiel compreensão. Sua redação deve ser definitiva a fim de evitar modificações nas provas de impressão, muito onerosas e cujo pagamento ficará sempre a cargo do autor. Os trabalhos (incluindo ilustração e tabelas) devem ser submetidos em triplicata (original e duas cópias).

Serão considerados para publicação apenas os artigos redigidos em inglês. Todos os trabalhos deverão ter resumos em inglês e português. Esses resumos deverão constar no início do trabalho e iniciar com o título traduzido para o idioma correspondente. O Abstract e o Resumo devem conter as mesmas informações e sempre sumariar resultados e conclusões.

Em linhas gerais, as diferentes partes dos artigos devem ter a seguinte seriação:

1ª página – Título do trabalho. Nome(s) do(s) autor(es). Instituição ou instituições, com endereço. Indicação do número de figuras existentes no trabalho. Palavras-chave em português e inglês (no máximo 5). Título abreviado para cabeça das páginas. Rodapé: nome do autor correspondente e endereço atual (se for o caso).

2ª página e seguintes – Abstract (sem título). Resumo: em português (com título); Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos.

Em separado - Referências, Legendas das figuras, Tabelas e Figuras.

As seguintes informações devem acompanhar todas as espécies citadas no artigo:

- Para zoologia, o nome do autor e da data de publicação da descrição original deve ser dada a primeira vez que a espécie é citada nos trabalhos;

- Para botânica e ecologia, somente o nome do autor que fez a descrição deve ser dada a primeira vez que a espécie é citada nos trabalhos.

O trabalho deverá ter, *no máximo*, 25 páginas, incluindo tabelas e figuras, em caso de Notes and Comments limitar-se a 4 páginas.

A seriação dos itens de Introdução e Agradecimentos só se aplicam, obviamente, a trabalhos capazes de adotá-la. Os demais artigos (como os de Sistemática) devem ser redigidos de acordo com critérios geralmente aceitos na área.

Referencias Bibliográficas:

1. Citação no texto: Use o nome e ano: Reis (1980); (Reis, 1980); (Zaluar e Rocha, 2000). Há mais de dois autores usar *et al.*
2. Citações na lista de referências, em conformidade com a norma **ISO 690/1987**.

No texto, será usado o sistema autor-ano para citações bibliográficas (estritamente o necessário) utilizando-se o utilizando-se **and** no caso de 2 autores. As referências, digitadas em folha separada, devem constar em ordem alfabética. Deverão conter nome(s) e iniciais do(s) autor(es), ano, título por extenso, nome da revista (abreviado e sublinhado), volume, e primeira e última páginas. Citações de livros e monografias deverão também incluir a editora e, conforme citação, referir o capítulo do livro. Deve(m) também ser referido(s) nome(s) do(s) organizador(es) da coletânea. Exemplos:

LOMINADZE, DG. *Cyclotron waves in plasma*. Traducido por AN. Dellis; editado por SM. Hamberger. 1st ed. Oxford: Pergamon Press, 1981. 206 p. International series in natural philosophy. Tradución de: Ciklotronnye volny v plazme. ISBN 0-08-021680-3.

PARKER, TJ. and HASWELL, WD., 1930. *A text-book of zoology*. 5th ed. vol 1. revised by WD. Lang. London: Macmillan. Section 12, Phylum Mollusca, p. 663-782.

WEAVER, W., 1985. The collectors: command performances. Photography by Robert Emmett Bright. *Architectural Digest*, December 1985, vol. 42, no. 12, p. 126 -133.

WRIGLEY, EA. Parish registers and the historian. In STEEL, DJ. *National index of parish registers*. London: Society of Genealogists, 1968, vol. 1, p. 15-167.

Para outros pormenores, veja as referências bibliográficas em um fascículo.

A Revista publicará um Índice inteiramente em inglês, para uso das revistas internacionais de referência.

As provas serão enviadas aos autores para uma revisão final (restrita a erros e composição) e deverão ser devolvidas imediatamente. As provas que não forem devolvidas no tempo solicitado - 5 dias - terão sua publicação postergada para uma próxima oportunidade, dependendo de espaço.

Material Ilustrativo – Os autores deverão limitar as tabelas e as figuras (ambas numeradas em arábicos) ao **estritamente necessário**. No texto do manuscrito, o autor indicará os locais onde elas deverão ser intercaladas.

As tabelas deverão ter seu próprio título e, em rodapé, as demais informações explicativas. Símbolos e abreviaturas devem ser definidos no texto principal e/ou legendas.

Na preparação do material ilustrativo e das tabelas, deve-se ter em mente o tamanho da página útil da REVISTA (22 cm x 15,0 cm); (coluna: 7 cm) e a idéia de conservar o sentido vertical. Desenhos e fotografias exageradamente grandes poderão perder muito em nitidez quando forem reduzidos às dimensões da página útil. As pranchas deverão ter no máximo 30 cm de altura por 25 cm de largura e incluir barra(s) de calibração.

As ilustrações devem ser agrupadas, sempre que possível. A Comissão Editorial reserva-se o direito de dispor esse material do modo mais econômico, sem prejudicar sua apresentação.

Todos os desenhos devem ser feitos à tinta da China e apresentados de tal forma que seja possível sua reprodução sem retoques. As fotografias devem vir em papel brilhante. Nas fotos, desenhos e tabelas deve-se escrever, a lápis, no verso, o nome do autor e o título do trabalho.

Disquete – Os autores são encorajados a enviar a versão final (e somente a final), **já aceita**, de seus manuscritos em disquete. Textos devem ser preparados em Word for Windows e acompanhados de uma cópia idêntica em papel.

Recomendações Finais: Antes de remeter seu trabalho, preparado de acordo com as instruções anteriores, deve o autor relê-lo cuidadosamente, dando atenção aos seguintes itens: correção gramatical, correção datilográfica (apenas uma leitura sílaba por sílaba a garantirá), **correspondência entre os trabalhos citados no texto e os referidos na bibliografia**, tabelas e figuras em arábicos, correspondência entre os números de tabelas e figuras citadas no texto e os referidos em cada um e posição correta das legendas.

Normas: Pesquisa Agropecuária Brasileira

Forma e preparação de manuscritos

- Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.
- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas, Novas Cultivares e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.
- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.
- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Organização do Artigo Científico

- A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:
- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.
- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.
- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.
- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como "efeito" ou "influência".
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que componham o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no [AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus](#) ou no [Índice de Assuntos da base SciELO](#).

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ocupar, no máximo, duas páginas.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material

e

Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados

e

Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Deve ocupar quatro páginas, no máximo.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).

- Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.

- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.

- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.

- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.

- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.

- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.

- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.

- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

- Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.
- A autocitação deve ser evitada.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Redação das citações dentro de parênteses
- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.
- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.
- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.
- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.
- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.
- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.
- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.
- Redação das citações fora de parênteses
- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas.
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve

- devem ser padronizados.
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
 - Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
 - As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
 - Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
 - Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
 - Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
 - No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
 - Não usar negrito nas figuras.
 - As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
 - Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

