

Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - FCBA
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade - PPGECB

A FLUORESCÊNCIA E A TEMPERATURA DA COROLA DE
Tropaeolum majus L. (TROPAEOLACEAE) INTERFEREM NA
ABUNDÂNCIA DE ABELHAS VISITANTES?

Claudemir Antonio Garcia Fioratti

Dourados-MS
Março de 2020

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Claudemir Antonio Garcia Fioratti

A FLUORESCÊNCIA E A TEMPERATURA DA COROLA DE
Tropaeolum majus L. (TROPAEOLACEAE) INTERFEREM NA
ABUNDÂNCIA DE ABELHAS VISITANTES?

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE.

Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosilda Mara Mussury Franco Silva

Dourados-MS
Março de 2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

F518f Fioratti, Claudemir Antonio Garcia Fioratti

A Fluorescência e a Temperatura da Corola de *Tropaeolum majus* L.
(TROPAEOLACEAE) Interferem na Abundância de Abelhas Visitantes? [recurso
Eletrônico] / Claudemir Antonio Garcia Fioratti. – 2022.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Rosilda Mara Mussury Franco Silva.
Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade)-Universidade Federal
da Grande Dourados, 2020.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. capuchinha. 2. visitantes florais. 3. percepção visual. 4. atributo floral. 5. himenópteros. I.
Silva, Rosilda Mara Mussury Franco. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

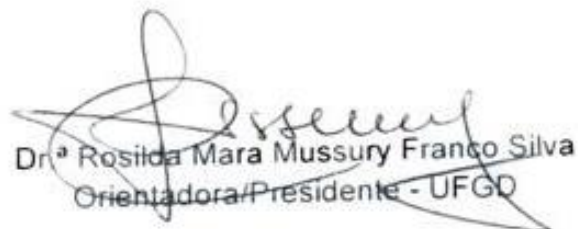
© Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

**"A FLUORESCÊNCIA E A TEMPERATURA DA COROLA DE *TROPAEOLUM MAJUS* L.
(TROPAEOLACEAE) INTERFEREM NA ABUNDÂNCIA DE ABELHAS VISITANTES?"**

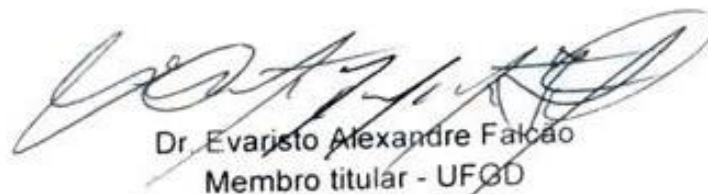
Por

CLAUDEMIR ANTONIO GARCIA FIORATTI

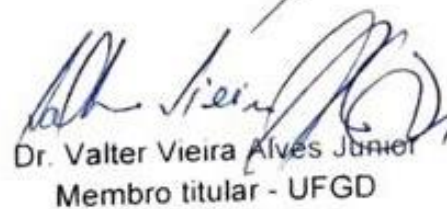
Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação



Dr.^a Rosilda Mara Mussury Franco Silva
Orientadora/Presidente - UFGD



Dr. Evaristo Alexandre Falcão
Membro titular - UFGD



Dr. Valter Vieira Alves Junior
Membro titular - UFGD

Aprovada em: 06 de março de 2020

BIOGRAFIA

Sou Claudemir Antonio Garcia Fioratti, natural de Sete Quedas – Mato Grosso do Sul, nasci no dia 13 de junho de 1994, e filho de Ana Maria Garcia Fioratti e Oscar Rossetto Fioratti. Cursei o Ensino Fundamental (2001 a 2009) na Escola Municipal Osvaldo Cruz no Município de Sete Quedas/MS e Escola Estadual José Edson no Município de Ponta Porã/MS. E o Ensino Médio (2010 a 2012) na Escola Estadual José Edson e Escola Estadual Nova Itamarati, localizadas no Município de Ponta Porã/MS.

Graduei em Ciências Biológicas – Bacharelado (2013 a 2017) pela Universidade Federal da Grande Dourados, no qual participei de diversos programas dentro da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, entre eles: Programa de Educação Tutorial (PET) (2015 a 2017), Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica (PIVIC) (2016 a 2017) e Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) (2017 a 2018). Fui coordenador do Centro Acadêmico Charles Darwin (2016 a 2017), realizando diversos eventos científicos, minicursos, palestras, e workshops teóricos e práticos que buscavam unir os acadêmicos do curso e atualizá-los sobre os assuntos do meio científico. Em 2015, finalizei meu Trabalho de Conclusão de Curso no Laboratório de Interação Inseto-Planta, com o título “Antibiose de extrato aquoso e etanólico de *Duguetia furfuracea* sobre *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)”, sob a orientação da Professora Dr^a. Rosilda Mara Mussury, que também foi minha tutora/orientadora no PET e nos programas PIBIC e PIVIC.

No início de 2018 retornei ao curso de Ciências Biológicas como portador de diploma na modalidade licenciatura e neste mesmo ano ingressei no Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade a nível de Mestrado.

Atualmente sou mestrando no Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da UFGD, com bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, onde pesquiso se a fluorescência e a temperatura da corola de *Tropaeolum majus* L. (TROPAEOLACEAE) interferem na abundância de abelhas visitantes.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dr^a. Rosilda Mara Mussury, por ser essa mulher forte, guerreira e antes de tudo uma amiga. Gratidão por todo o ensinamento, dedicação e apoio durante a realização deste trabalho, pela paciência e sugestões que me tornaram um pesquisador melhor, enriquecendo minha formação profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade (PPGECB), Adelita Maria Linzmeier, Ivana Fernandes da Silva, Laura Jane Gisloti, Viviana de Oliveira Torres, Wedson Desidério Fernandes, que me auxiliaram nas disciplinas durante o mestrado.

Ao Secretário do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade (PPGECB), Vítor Cunha Gomes Sfeir, por sempre sanar nossas dúvidas e estar disposto nos auxiliando em todos os momentos em que estamos em total desespero.

Aos professores da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), Filomena Parrella Balestiere, Fabiano Antunes, Fátima Cristina De Lazari Manente Balestieri, Joseana Stecca Farezim Knapp, pelo amparo e conhecimentos transmitidos durante minha graduação.

À minha mãe, Ana Maria Garcia Fioratti por todo o apoio aos estudos, pela constante luta, pelo amor e carinho. Ao meu pai, Oscar Rossetto Fioratti, pelo amor, carinho, por sempre acreditar em mim e por toda sua força que me inspira a continuar minha trajetória de vida acadêmica e pessoal. Aos meus irmãos por todo apoio durante está caminhada, em especial a minha irmã Cláudia Aparecida Garcia Fioratti.

À Prof^a Dr^a Maria do Carmo Vieira, pelo espaço cedido no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), e todo o amparo pelo plantio da capuchinha para que pudesse ser realizado os experimentos.

À Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia (FACET) e ao Grupo de Óptica Aplicada (GOA) pelo espaço cedido realização das análises da pesquisa e ao Prof^o Dr^o Evaristo Alexandre Falcão por todo conhecimento e ajuda durante o preparo dos testes e análises.

Aos meus pet's e companheiros, Sibylla Maria, Marie Curie, Agatha, Neguinha e Galileu Galilei (*in memorium*), por me dar muito afeto e carinho durante essa jornada, principalmente durante os dias de escrita.

Ao meu namorado Ueslei Alves de Oliveira, pelo companheirismo, afeto e conselhos durante a jornada final desta dissertação e a publicação do artigo.

Aos meus colegas de laboratório e irmãos científicos, gratidão pelos momentos que passamos juntos, em especial a Rosicleia Matias da Silva uma grande amiga que encontrei nessa caminhada, grato pelo apoio emocional e por estar ao meu lado durante esse processo de crescimento e evolução, e a Leticia Paula dos Santos pelas conversas partilhas, conselhos e amizade.

Aos meus amigos de curso, Cristiano Ramos e Manuela Scarpa, que não mediram esforços para que essa jornada fosse um momento de plena descontração e luz. Gratidão por ter encontrado seres de plena compaixão.

Aos meus amigos, Paulo César Pereira, Leticia Souza e Eduardo Neves, pelo inestimável apoio e carinho.

Aos membros da *banca examinadora*, pela disponibilidade de participar e pelas riquíssimas contribuições pessoais e acadêmicas acerca da dissertação.

À Universidade Federal da Grande Dourados por toda a infraestrutura cedida.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À FUNDECT, pelo financiamento concedido.

À todos vocês, a minha sincera sensação de gratidão.

*Aos meus amados pais, Oscar Rossetto Fioratti e Ana Maria G. Fioratti,
Com amor, admiração e gratidão pela compreensão, carinho, dedicação e
apoio durante toda minha jornada.*

*Aos meus irmãos, Cláudia A. G. Fioratti e Claudinei G. Fioratti,
Por comemorarem ao meu lado todas as minhas conquistas como
se fossem suas.*

Com muito amor e gratidão.

“Que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja a nossa própria substância, já que viver é ser livre.”

(Simone de Beauvoir)

LISTA DE FIGURAS – REVISÃO

Figura 1. Espectro eletromagnético da luz visível.....	20
Figura 2. Espectro de absorção da Clorofila <i>a</i> e <i>b</i> (A) e espectro de absorção dos carotenoides (B).....	21

LISTA DE FIGURAS – ARTIGO

Figure 1: Experimental design of the sampling site containing the transects and plots with plants and flowers of <i>T. majus</i> and the hours of observation of the visiting bees.....	34
Figure 2: Corollas of <i>Tropaeolum majus</i> different colors found in transects and plots during the visit of bees. (A) Orange; (B) orange-red; (C) yellow; (D) yellow-red; (E) red.....	34
Figure 3: Dispersion corresponding to Spearman’s coefficient correlations between the temperature of the <i>Tropaeolum majus</i> corolla and the abundance of <i>Trigona spinipes</i> (A), <i>Apis mellifera</i> (B), <i>Paratrigona lineata</i> (C), and the abundance of <i>Trigona spinipes</i> (D), <i>Apis mellifera</i> (E), and <i>Paratrigona lineata</i> (F) and the average temperature of the corollas of different colors of <i>Tropaeolum majus</i> flowers. * Statistical significance of spearman correlation, p -value ≤ 0.05	38
Figura 4: Dispersion corresponding to Spearman’s coefficient correlations between the abundance of visiting bee species and the temperature of the day in the three observation times, from 9:00 a.m. to 10:00 a.m. (A), 12:00 p.m. to 1:00 p.m. (B), and from 2:00 p.m. to 3:00 p.m. (C) during the seven weeks of flowering of <i>Tropaeolum majus</i> . * Statistical significance of spearman correlation, p -value ≤ 0.05	39
Figura 5: Corolla temperature averages of different <i>Tropaeolum majus</i> flower colors.....	40
Figure 6: Fluorescence intensity (in arbitrary units, a.u.) at different wavelengths of orange, yellow and red corolla flowers (A), nectar-guided flowers (orange-red and yellow-red) (B) of <i>Tropaeolum majus</i> . Fluorescence intensity corresponding to fluorophores and flavonols (A(a), B(a)—black); β -carotene and anthocyanin (A(b), B(b)—dark gray); and chlorophyll (A(c), B(c)—light gray).....	40

Figure 7: Excitation–emission matrix spectra of *Tropaeolum majus* flower extracts in orange (A), yellow (B), orange-red (C), yellow-red (D), and red (E) colors.....41

LISTA DE TABELAS – ARTIGO

Table 1. Abundance of visiting bee species in *Tropaeolum majus* flowers of different colors.....36

Table 2. Abundance of visiting bee species in *Tropaeolum majus* flowers at different day times.....37

SUMÁRIO

RESUMO GERAL _____	13
ABSTRACT _____	14
1. INTRODUÇÃO GERAL _____	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	18
2.1. Interação inseto-planta _____	18
2.2. Percepção de cores pelos insetos _____	19
2.3. <i>Tropaeolum majus</i> _____	21
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA _____	23
4. HIPÓTESES _____	30
5. OBJETIVO GERAL _____	30
ARTIGO _____	31

ARTIGO

Application of Optical Fluorescence Spectroscopy for Studying Bee Abundance in *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae)

1. INTRODUCTION _____	33
2. MATERIALS AND METHODS _____	33
2.1. Experimental Procedures _____	34
2.2. Pigment Extraction _____	35
2.3. Fluorescence Measurements _____	35
2.4. Statistical Analysis _____	35
3. RESULTS AND DISCUSSION _____	36
4. CONCLUSIONS _____	42
REFERENCES _____	43

RESUMO GERAL

Algumas espécies de plantas possuem a capacidade de produzirem flores de diferentes tonalidades, desde o amarelo ao vermelho, como é o caso de *Tropaeolum majus*. Essa diversidade de cores das flores decorre da presença de metabolitos secundários que absorvem os raios UV e emitem as cores das pétalas. Sendo assim, as abelhas adaptaram sua visão a alterações de emissão UV, e com isso conseguem identificar as flores a longas distâncias. Diante disso, poucos trabalhos têm abordado a relação entre a cor da corola e os visitantes florais, por isso o presente trabalho teve como objetivo, verificar se existe relação entre as diferentes cores da corola de *T. majus* e a abundância de abelhas visitantes, utilizando a espectroscopia de fluorescência óptica e análise climática. Na área experimental observamos as abelhas que visitavam flores de *T. majus*, bem como a temperatura e coloração das flores visitadas e as condições climáticas do dia no período de sete semanas. Nos transectos de *T. majus* foram encontradas um total de 1.035 de abelhas das espécies *Apis mellifera*, *Paratrigona lineata* e *Trigona spinipes*, sendo esta última mais ativa nas visitas. Quando observado a cor da corola, as flores de cor amarelo e laranja receberam mais visitantes, especialmente de *A. mellifera* e *T. spinipes*. Dentre os horários preferido pelas abelhas, *T. spinipes* preferiu os três diferentes horários (9h00 às 10h00; 12h00 às 13h00 e das 14h00 às 15h00) diferindo significativamente das demais, entretanto, *A. mellifera* preferiu o horário da manhã (9h00 às 10h00) para realizar suas visitas. Para os testes de correlação observamos que a abundância de espécies de abelhas visitantes e a temperatura média da corola de diferentes cores foi considerada positiva e significativa entre *T. spinipes* e flores laranja, *A. mellifera* e flores laranja com vermelho e vermelho e entre *P. lineata* e flores vermelho, onde a abundância de abelhas aumentava, quando aumentava a temperatura da corola das flores. Para a correlação da abundância de espécies de abelhas visitantes com as condições climáticas (temperatura, umidade relativa e velocidade do vento) em diferentes horários do dia, observamos uma correlação positiva e significativa apenas entre *T. spinipes* e a temperatura das 9h00 às 10h00, entretanto, das 12h00 às 13h00 *T. spinipes* houve correlação positiva e significativa com todas as condições climáticas do dia, enquanto que para o horário das 14h00 às 15h00, apenas *P. lineata* houve uma correlação positiva e significativa com a temperatura do dia. Para os testes de fluorescência, os extratos das flores foram medidos em duas configurações experimentais diferentes. A primeira consistiu em obter melhores resoluções de espectros de fluorescência e entender os

mecanismos vegetais envolvidos nelas. O segundo objetivou simular a exposição das flores de *T. majus* à luz solar. Como resultado as flores de cor laranja e amarelo apresentaram temperaturas e emissões de fluorescência mais altas do que as vermelhas e aquelas com guias de néctar, amarelo com vermelho e laranja com vermelho. As flores laranja emitiram um espectro UV de banda larga (entre 475 e 800 nm). Esse intervalo pode ser devido a compostos como ácido hidroxicinâmico, flavonóis, isoflavonóides, flavonas, ácido fenólico e clorofila. Extratos de diferentes cores da corola mostraram que as flores emitem sinais fluorescentes específicos, principalmente relacionados à visão e aprendizado das cores pelas abelhas, atuando assim como meio de comunicação entre as abelhas e as flores. Sendo assim, conclui-se que as características da cor da corola interferem a abundância de espécies de abelhas visitantes, assim como existe uma relação entre as visitas das abelhas com os compostos florais presentes nas diferentes cores das flores, sendo o composto kaempferol o mais abundante nas flores laranja o responsável pela maior emissão de fluorescência dessas flores, e conseqüentemente, sendo as florais mais visitadas pelas espécies de abelhas presentes nos transectos de *T. majus*.

PALAVRAS-CHAVES: capuchinha, visitantes florais, percepção visual, atributo floral, himenópteros.

ABSTRACT

Some plant species have the ability to produce flowers of different shades, from yellow to red, as is the case of *Tropaeolum majus*. This diversity of flower colors stems from the presence of secondary metabolites that absorb UV rays and emit the colors of the petals. Thus, the bees have adapted their vision to changes in UV emission, and with this they are able to identify the flowers at long distances. Therefore, few works have addressed the relationship between the color of the corolla and the floral visitors, so the present work aimed to verify if there is a relationship between the different colors of the corolla of *T. majus* and the abundance of visiting bees, using optical fluorescence spectroscopy and climate analysis. In the experimental area, we observed the bees that visited *T. majus* flowers, as well as the temperature and color of the visited flowers and the weather conditions of the day in the period of seven weeks. A total of 1,035 bees of the species *Apis mellifera*, *Paratrigona lineata* and *Trigona spinipes* were found in the transects of *T. majus*, the latter being more active in the visitations. When observing the color of the corolla, the yellow and orange flowers received more visitors, especially from *A.*

mellifera and *T. spinipes*. Among the times preferred by bees, *T. spinipes* preferred the three different times (9:00 am to 10:00 am; 12:00 pm to 1:00 pm and from 2:00 pm to 3:00 pm) differing significantly from the others, however, *A. mellifera* preferred the morning time (9:00 am to 10:00 am) for make your visits. For the correlation tests, we observed that the abundance of visiting bee species and the average temperature of the corolla of different colors was considered positive and significant between *T. spinipes* and orange flowers, *A. mellifera* and flowers orange-red and red and between *P. lineata* and red flowers, where the abundance of bees increased when the temperature of the flower corolla increased. For the correlation of the abundance of visiting bee species with climatic conditions (temperature, relative humidity and wind speed) at different times of the day, we observed a positive and significant correlation only between *T. spinipes* and the temperature from 9:00 am to 10:00 am, however, from 12:00 pm to 1:00 pm *T. spinipes* had a positive and significant correlation with all weather conditions of the day, while for the time from 2:00 pm to 3:00 pm, only *P. lineata* had a positive and significant correlation with the temperature of the day. For fluorescence tests, flower extracts were measured in two different experimental settings. The first consisted of obtaining better resolutions of fluorescence spectra and understanding the plant mechanisms involved in them. The second aimed to simulate the exposure of *T. majus* flowers to sunlight. As a result, the orange and yellow flowers showed higher temperatures and fluorescence emissions than the red ones and those with nectar guides, yellow-red and orange-red. The orange flowers emitted a broadband UV spectrum (between 475 and 800 nm). This range may be due to compounds such as hydroxycinnamic acid, flavonols, isoflavonoids, flavones, phenolic acid, and chlorophyll. Extracts of different corolla colors showed that flowers emit specific fluorescent signals, mainly related to vision and color learning by bees, thus acting as a means of communication between bees and flowers. Therefore, it is concluded that the corolla color characteristics interfere with the abundance of visiting bee species, as well as there is a relationship between the visits of the bees with the floral compounds present in the different colors of the flowers, with the kaempferol compound being the most abundant. in orange flowers, responsible for the highest emission of fluorescence of these flowers, and consequently, being the floral, most visited by the species of bees present in the transects of *T. majus*.

KEYWORDS: Capuchinhas, floral visitors, visual perception, floral attribute, hymenoptera.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Tropaeolum majus L. (Tropaeolaceae), conhecida popularmente como capuchinha, é uma planta semi-perene, ocorrendo no Brasil, Peru e Colômbia como centro de diversidade primária (PINTÃO et al., 1995; CESSA et al., 2009). Devido a sua rusticidade e fácil adaptação a climas variados, espalhou-se rapidamente para outros continentes (DEMATTI e COAN, 1999; FRIEDMAN et al., 2007).

Suas flores apresentam uma variedade na tonalidade da corola, predominando as vermelhas, amarelas e laranja-claro (PEDROSA et al., 2012; BORGUINI et al., 2018). A capuchinha possui a capacidade de atrair lepidópteros e repelir alguns insetos, além disso apresenta grande valor na apicultura comercial, por atrair diversas espécies de himenópteros (ORTIZ DE BOADA e GOGUA, 1989) e por isso recomenda-se o seu cultivo juntamente com outras espécies vegetais (BRASIL, 2010)

Compreender as interações entre insetos e plantas é de suma importância para o conhecimento da biodiversidade (SCHOONHOVEN et al., 1998), pois os recursos fornecidos pelas plantas são fundamentais para a adaptação dos animais atualmente existentes (PRICE, 2002). Em algumas plantas, os insetos podem encontrar fonte de alimentos, locais para proteção, acasalamento e oviposição enquanto em outras, as plantas apresentam comportamento de antibiose e antixenose que impede a aproximação dos insetos (MALERBO-SOUZA et al., 2008).

Visitantes florais podem atuar como polinizadores (KEARNS et al., 1998; SPEIGHT et al., 1999), garantindo o sucesso reprodutivo e conseqüentemente conferindo a manutenção da variabilidade genética da flora. Plantas com flores podem ser polinizadas por agentes bióticos transferidores de pólen, como as abelhas, vespas, borboletas, besouros, moscas e até alguns vertebrados, sendo que cada detalhe das peças florais está intimamente relacionado com o tipo de agente polinizador (EDWARDS e WRATTER, 1981).

Sabe-se que as flores de *T. majus* com altas concentrações de açúcares e néctar atraem maior diversidade de Chloropidae (Diptera), que consomem néctar e pólen e utilizam partes da flor, com pétalas e estames, para acasalar e ovipositar. Espécies de Aphididae e Cicadellidae (Hemiptera) atuam como fitófagas, as espécies de Apidae, Megachilidae e Formicidae (Hymenoptera) e as de Melyridae e Crysomelidae (Coleoptera) foram encontradas buscando por néctar, pólen e até mesmo realizando

controle biológico do meio, sendo considerados polinizadores efetivos (SILVA et al. 2011).

Durante o processo evolutivo as flores desenvolveram mecanismos, como coloração das pétalas, perfume, produção de néctar, quantidade de pólen durante o dia, essências e óleos para atrair os visitantes florais e, conseqüentemente obter a polinização. No entanto, nem todos os visitantes florais são eficientes polinizadores, já que há a necessidade de adaptações entre as características da flor e seu(s) polinizador(es) efetivo(s) (COUTO e COUTO 2006).

A importância das abelhas como polinizadores é amplamente difundida, porém as ações antrópicas estão afetando diretamente a população desses Apoidea, podendo levá-los à extinção e, conseqüentemente, ao desaparecimento de algumas espécies de plantas pela falta de polinizadores (LAROCA e ORTH, 2002). O inventariamento dos visitantes florais, notadamente as abelhas, é importante, tanto para o conhecimento das espécies que são polinizadoras eficientes das culturas, como para avaliar o nível de preservação ou declínio de suas populações nas áreas agrícolas (SANTANA et al., 2002).

Apesar da grande diversidade de visitantes florais para *T. majus*, mais informações são necessárias para se esclarecer a relação entre esses indivíduos e a planta, levando em consideração o sistema reprodutivo (SILVA et al., 2011). A forma, o tamanho e o odor são parâmetros florais que tem sido estudado por revelarem implicações importantes, não apenas na relação planta-polinizador, mas também na sua capacidade de influenciar no sucesso reprodutivo da planta (BARBOSA, 1997).

Portanto, torna-se importante compreender as interações que ocorrem entre *T. majus* e seus visitantes florais, levando em consideração a escassez de trabalhos referente ao assunto. Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo verificar se a abundância de abelhas está associada com a coloração da corola de *Tropaeolum majus* e as condições climáticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Interação inseto-planta

Os insetos e as plantas coexistem no planeta há pelo menos 100 milhões de anos e durante esse período desenvolveram diversos tipos de interações (STOLTZ et al., 1999). Registros fósseis apontam que as primeiras interações entre esses grupos eram do tipo antagônicas, onde os insetos se alimentavam de esporos ou apresentavam o hábito de perfuração e sucção do material vegetal (LABANDEIRA e SEPKOSKI, 1993; LABANDEIRA, 1998; DEL-CLARO, 2012).

Por sua vez, as plantas desenvolveram estratégias de defesas químicas e físicas a fim de minimizar os danos e ataques produzidos pelos insetos (MARQUIS, 2012; CALIXTO et al., 2015). Ao longo do processo evolutivo, as plantas desenvolveram estruturas que são utilizadas como abrigo e/ou alimento para possíveis predadores de seus herbívoros, em troca eles oferecem proteção à planta, numa ação mutualística (BEATTIE, 1985; BRONSTEIN, 1998; RICO-GRAY e OLIVEIRA, 2007). Essa estratégia é denominada de defesa biótica.

O processo da polinização é outro exemplo de relação mutualística que ocorre na interação inseto-planta, onde os polinizadores visitam as flores em busca de recursos nutricionais e, conseqüentemente, acabam polinizando as flores com maior eficiência (BOBERG et al., 2013; CERQUEIRA, 2015). A coloração da corola, os guias de néctares, as glândulas odoríferas, formato e simetria são características das flores responsáveis por atrair os polinizadores e visitantes florais. Estes caracteres variam de planta para planta (LEHRER et al., 1995; DEPRÁ e GAGLIANONE, 2018).

As flores apresentam um conjunto de tributos que indica seu provável agente polinizador, essa combinação de atributos é denominada síndrome de polinização. As síndromes são baseadas nas características florais tais como formato e coloração da flor, tipo de recurso oferecido e disposição dos elementos reprodutivos (FAEGRI e VAN DER PIJL, 1979). Ou seja, os atributos florais que atraem as abelhas até a flor são diferentes dos atributos que atraem outros visitantes florais.

As flores melitófilas geralmente exalam um perfume adocicado e possuem pétalas vistosas e coloridas (amarelas ou azuis), que estão posicionadas de modo a possibilitar o pouso de uma abelha. Além disso, essas flores fornecem quantidade moderada de néctar. Enquanto as flores polinizadas por besouros apresentam cores pouco

vistas (brancas) e exalam odor muito forte, semelhante a frutos (SOARES 1993; CARVALHO e WEBBER, 2000; RAVEN et al. 2001).

2.2. Percepção de cores pelos insetos

Dentre os atributos, a coloração da corola é considerada a mais importante, pois permite o reconhecimento da flor pelos agentes polinizadores à distância (MENZEL et al., 1997; SPAETHE et al., 2001). Vale ressaltar que os insetos apresentam um sistema visual para identificação de padrões de coloração, diferente dos seres humanos, por exemplo, a maioria dos insetos não consegue distinguir a cor vermelha (OKUNO et al., 1986; GOLDSMITH, 2006; ROBINSON, 2007), enquanto outros insetos são capazes de perceber a radiação ultravioleta emitido pelas flores e seus guias de néctar. Os estudos envolvendo abelhas demonstraram que elas apresentam uma faixa de sensibilidade ao ultravioleta (340 nm), azul (430 nm) e verde (540 nm) (VON FRISCH, 1976; RODRÍGUEZ-GIRONÉS e SANTAMARÍA, 2004).

A coevolução entre as flores e os lepidópteros apresenta semelhanças com as flores polinizadas por abelhas, pois as borboletas e mariposas também são guiadas até às flores por meio da visão e olfato, entretanto, algumas espécies são capazes de perceber a cor vermelho e laranja (RAVEN et al., 2001).

Os dípteros possuem visão colorida e tricromática que permitem distinguir outros grupos de cores, como amarelo e azul (WILLMER 2011). Syrphidae, Calliphoridae, Tephritidae e Anthomyiidae apresentam preferência pela coloração amarela, devido sua associação com o comprimento de onda refletido pelos grãos de pólen (WEISS, 2001; WILMER, 2011).

Os coleópteros são sensíveis a diferentes intensidades de cores, desde que estas estejam dentro do campo de visão monocromático. Esses insetos possuem pouca acuidade visual, o que pode ser explicado pelo baixo número de omatídeos presentes nos olhos compostos (BYERS, 2004), como foi relatado por Flechtmann et al, (1997) que as cores branca e amarela refletidas, geralmente encontradas em plantas hospedeiras, atuam como atrativos para os coleópteros bostrichídeos.

Ainda que os insetos tenham uma preferência por algumas cores, eles são frequentemente vistos forrageando em diversas espécies de plantas com diferentes características florais. Esse fato ocorre devido sua capacidade visual de identificar cores

que vão desde a faixa do ultravioleta (320 nm) até próximo ao vermelho (600-650 nm) (Figura 1) (SRINIVASAN, 2010; BRITO et al., 2014; IBARRA et al., 2014).

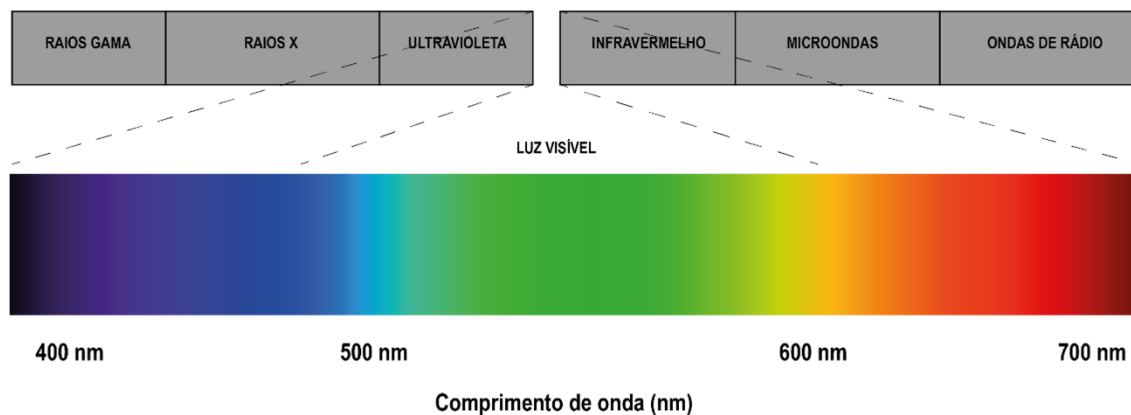


Figura 1. Espectro eletromagnético da luz visível. Fonte: Fernandes, 2016.

Considera-se que todos os insetos polinizadores são sensíveis à faixa do ultravioleta, pois as flores de diversas famílias botânicas refletem nessa faixa do espectro, permitindo que insetos capazes de perceber esses comprimentos de onda possam explorar os recursos fornecidos (GULDBERG e ATSATT, 1975).

Em relação aos pigmentos encontrados nas plantas como a clorofila e carotenoides, estes evoluíram para absorver apenas certos comprimentos de onda (cores) da luz visível. Os pigmentos refletem ou transmitem os comprimentos de onda que não podem absorver, fazendo com que apareçam na cor correspondente. Cada tipo de pigmento pode ser identificado pelo padrão específico de comprimento de onda que absorve da luz visível, que é o espectro de absorção (RAVEN et al., 2007). A Figura 2 mostra os espectros de absorção da clorofila *a*, clorofila *b* e um tipo de pigmento carotenóide chamado β -caroteno (que absorve a luz azul e verde). Observe como cada pigmento tem um conjunto distinto de altos e baixos, revelando um padrão de absorção altamente específico. A clorofila *a* absorve os comprimentos de onda de qualquer extremidade do espectro visível (azul e vermelho), mas não verde. Como o verde é refletido ou transmitido, a clorofila aparece em verde (TAIZ e ZEIGER, 2013; CLARO et al, 2019) (Figura 2A). Os carotenóides absorvem na região azul de comprimento de onda curto e refletem os comprimentos de onda amarelos, vermelhos e laranja mais longos (TAIZ e ZEIGER, 2004; CLARO, 2019) (Figura 2B).

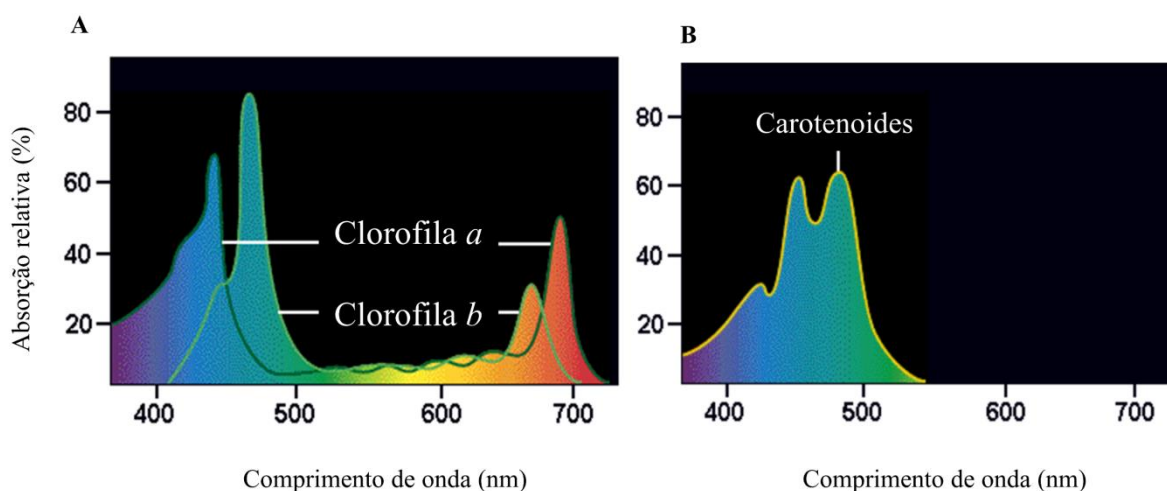


Figura 2: Espectro de absorção da Clorofila *a* e *b* (A) e espectro de absorção dos carotenoides (B). Fonte: Instituto Ciências Biológicas/UFG, 2014.

2.3. *Tropaeolum majus*

A família Tropaeolaceae, a qual pertence à espécie *Tropaeolum majus* L., é composta por três gêneros: *Trophaestrum* Sparre (1 sp.), *Tropaeolum* L. (95 spp.) e *Magallana* Cav. (2 spp.). As espécies dessa família apresentam distribuição Neotropical, sendo nativas da América do Sul (Argentina, Brasil, Peru e Colômbia), e caracterizam-se por serem ervas anuais ou perenes (SOUZA e LORENZI, 2008).

No Brasil, essa família é representada apenas pelo gênero *Tropaeolum* L. (SOUZA e SOUZA, 2002), como é o caso do *Tropaeolum majus* L., popularmente conhecido como capuchinha, agrião de jardim, nastúrcio, chaguinha, chagas, mastruço-do-Peru, flor-de-sangue, agrião-do-México ou agrião índico (DEMATTI e COAN, 1999; FURLAN, 1999).

O termo *Tropaeolum* vem do grego tropaion, que significa tropa, fazendo alusão à suposta forma de escudo resultante das folhas que são sempre acompanhadas de flores, cujos formatos se assemelham a capacetes, enquanto o nome capuchinha remete à flor que vista por trás, lembra um capuz (CORREA, 1984; FONT QUER, 2005).

Trata-se de uma planta rústica com período de germinação de 5 a 14 dias e sete semanas de florescimento, dependendo das condições climáticas e características físico-químicas do solo. O caule do *T. majus* é arredondo e desenvolve-se em zig-zag, formando ângulos de 120-135°. Apresenta coloração verde claro com ausência de pelos, podendo atingir em média 1 cm de diâmetro, e chegar a 5 m de comprimento e a planta forma uma

raiz avermelhada e longa, porém pobre em ramificações, o que torna fácil possível se arrancar a planta do solo com facilidade (ZANETTI et al., 2004)

As folhas do *T. majus* apresentam coloração verde, alternas com limbo peltado. Possuem de nove a onze nervuras principais saindo do ponto de inserção do pecíolo, além de apresentarem margem inteira com reentrância pouco pronunciada junto às nervuras de grande porte. Suas flores são solitárias, grandes e vistosas, variando entre brancas, amarelas, laranjas, vermelhas e vermelhas com manchas no seu interior, que caracterizam os guias de néctar (PANIZZA, 1997; ZANETTI et al., 2004).

Os frutos são do tipo esquizocárpico tricoca. As cocas, por sua vez, são carnosas e sulcadas longitudinalmente. As sementes apresentam-se com endosperma e embrião crassos (PEDROSA et al., 2012).

A planta possui alta resistência e é facilmente adaptável a qualquer tipo de clima. Floresce durante quase todo o ano, entretanto, o desenvolvimento da planta tem destaque em épocas com temperaturas mais elevadas. Além disso, esta planta é recomendada para cultivo com outras espécies, devido a sua capacidade de atrair lepidópteros, repelir pulgões e besouros e melhorar o crescimento de outras plantas, como rabanete, repolho, tomate e pepino (BRASIL, 2010).

Tropaeolum majus é uma das plantas precursoras do mercado de flores comestíveis, sendo a mais consumida e utilizada no preparo de diversos pratos. Possui sabor fresco e picante que lembra o agrião, devido à presença de compostos sulfurosos. Essa composição confere um toque exótico às saladas, bebidas e sobremesas (MELO et al., 2003; RIBEIRO et al., 2012; SILVA, 2012).

A espécie é amplamente utilizada como ornamental, devido à coloração das suas pétalas que são determinadas pela quantidade de carotenoides e antocianinas (TAIZ e ZEIGER, 2013; COSTA et al., 2014). Além disso, a presença de metabólitos secundários tem favorecido sua aplicação na medicina natural (CORREA, 1984; FERREIRA et al., 2005).

3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BARBOSA, A. A. 1997. Biologia reprodutiva de uma comunidade de Campo Sujo, Uberlândia -MG. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1997.

BEATTIE, A. J. The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms. New York: Cambridge University, 1985.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de hortaliças não-convencionais**. Brasília, 2010.

BOBERG, E.; ALEXANDERSSON, R.; JONSSON, M.; MAAD, J.; AGREN, J.; NILSSON, L.A. Pollinator shifts and the evolution of spur length in the moth-pollinated orchid *Platanthera bifolia*. *Annals of Botany*, v. 113, p. 267-275, 2013.

BORGUINI, R. G.; BOTREL, N.; PACHECO, S.; NASCIMENTO, L. D. S. D. M.; SANTIAGO, M. C. P. D. A.; GODOY, R. L. D. O. Flores de capuchinha: uma hortaliça não-convencional rica em carotenoides. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, p. 1-5, 2018.

BROSTEIN, J. L. The contribution of ant plant protection studies to our understanding of mutualism. **Biotropica**, v. 30, p. 150-161. 1998.

BRITO, V. L. G.; TELLES, F.; LUNAU, K. Ecologia cognitiva da polinização. In: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E. A. M.; MACHADO, I. C. *Biologia da Polinização*. Editora Projeto Cultural, 2014, 524p.

BYERS, J. A. Chemical ecology of bark beetles in a complex olfactory landscape. In: LIEUTIER, F. et al. *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*, Dordrecht: Springer, 2004.

CALIXTO, E. S.; LANGE, D.; DEL-CLARO, K. Foliar anti-herbivore defenses in *Qualea multiflora* Mart. (Volchysiaceae): changes strategy according to leaf development. **Flora**, v. 212, p. 19-23. 2015.

CARVALHO, R.; WEBBER, A. C. Biologia floral de *Unonopsis guatterioides* (A. D.C.) R.E. Fr., uma Annonaceae polinizada por Euglossini. **Revista Brasileira de Botânica**, v.23, p. 419 - 423, 2000.

CERQUEIRA, S. Aspectos morfológicos dos insetos e sua importância na polinização. Dissertação de Mestrado em Biologia da Conservação. Escola de Ciências e Tecnologia - Universidade de Évora, 2015.

CESSA, R. M. A. Produção de capuchinha cultivada em vaso com diferentes doses de fósforo e potássio em casa de vegetação. **Global Science Technology**, v. 2, p.1-07, 2009.

CLARO, P. R. Cores de outono. **Revista de Ciência Elementar**, v. 7, n. 2, 2019.

CORRÊA, M. P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: **Imprensa Nacional**, v. 1, p. 667-774, 1984.

COSTA, L. C.; RIBEIRO, W. S.; BARBOSA, J. A. Compostos bioativos e alegações de potencial antioxidante de maracujá, cravo amarelo, rosa e capuchinha. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 16, p. 279–289, 2014.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. Apicultura: manejo e produtos. **3. ed. Jaboticabal: Funep**, 2006.

DEL-CLARO, K. Origens e importância das relações plantas-animais para a ecologia e conservação. In: DEL-CLARO, K.; TOREZAN-SILINGARDI, H. M. (Eds.). Ecologia das interações plantas-animais: uma abordagem ecológico-evolutiva. Rop de Janeiro: Technical Books, 2012.

DEMATTI, M. E. S. P.; COAN, R. M. Jardins com plantas medicinais. **Jaboticabal: FUNEP**, p. 65, 1999.

DEPRÁ, M. S.; GAGLIANONE, M. C. Interações entre plantas e polinizadores sob uma perspectiva temporal. **Oecologia Australis**, v. 22, p. 1-16, 2018.

EDWARDS, P. J.; WRATTEN S. D. Ecologia das interações entre insetos e plantas. **Editores da Universidade de São Paulo**, p. 71, 1981.

FAEGRI, K.; VAN DER PILJ, L. The principles of pollination ecology. **3. ed.** New York: Pergamon, p. 224, 1979.

FERREIRA, R. B. G.; VIEIRA, M. C.; ZÁRETE, N. A. H. Análise de crescimento de *Tropaeolum majus* “Jewel” em função de espaçamentos entre plantas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, p. 57–66, 2005.

FLECHTMANN, C. A. H.; TEIXEIRA, E. P.; GASPARETO, C. L. Influência das cores na atração de Bostrichidae (Coleoptera) em área de pinheiro tropical em **Agudos, Revista Instituto Florestal**, v. 9, p. 1-17, 1997.

FONT QUER, P. Plantas medicinales: el dioscórides renovado. Barcelona: **Editorial Labor**, 2005. v. 2. 637 p.

FRIEDMAN, H.; ROT, I.; AGAMI, O.; VINOKURY.; DORI, I; GANOT, L.; SHMUEL, D.; MATANE. Edible flowers: new crops with potential health benefits. **Acta Horticulturae**, v. 755, p. 283-289, 2007.

FURLAN, A. R. Cultivo de plantas medicinais. 2. ed. Cuiabá: SEBRAE/MT, 1999.

GULDBERG, L. D.; ATSATT, P. R. Frequency of reflection and absorption of ultraviolet light in flowering plants. **American Midland Naturalist**, p. 35-43, 1975.

GOLDSMITH, T. H. Olhos de Águia. **Scientific American Brasil**. São Paulo, v.5, n. 51, p. 70-77, 2006.

IBARRA N. H.; VOROBYEV M. E.; MENZEL, R. Mechanisms, functions and ecology of colour vision in the honeybee. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, v. 200, n. 6, p. 411–433, 2014.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W.; WASER, N. M. Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 83-112, 1998.

LABANDEIRA, C. C. Early history of arthropod and vascular plant associations. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 26, p. 329-377. 1998.

LABANDEIRA, C. C.; SPEKISKI, J. J. Insect diversity in the fossil record. **Science**. V. 261, n. 5119, p. 310-315. 1993.

LAROCA, S.; ORTH, A. I. Melissocoenology: historical perspective, method of sampling, and recommendations to the “Program of conservation and sustainable use of pollinator, with emphasis on bees” (ONU). In: KEVAN P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (Eds). Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature. Brasília: Ministry of Environment, Brazil, 2002.

LEHRER, M.; HORRIDGE, G. A.; ZHANG, S. W.; GADAGKAR, R. Shape vision in bees: innate preference for flower-like patterns. **Philosophical Transaction Royal Society B**, v. 347, p. 123-137, 1995.

MALERBO-SOUZA, D. T., TOLEDO, V. A. A.; PINTO, A. S. Ecologia da polinização. Piracicaba, p. 32, 2008.

MARQUIS, R. J. Uma abordagem geral das defesas das plantas contra a ação dos herbívoros. In: DEL-CLARO, K.; TOREZAN-SILINGARDI, H. M. (Eds.). Ecologia das interações plantas-animais: uma abordagem ecológico-evolutiva. Rop de Janeiro: **Technical Books**, 2012. p. 55-66.

MELO, E. F. R. Q.; SANTOS, O. S.; NOGUEIRA FILHO, H.; SINCHAK, S. S.; PUNTEL, R.; QUEVEDO, F. Avaliação do Crescimento de *Tropaeolum majus* L. em Hidroponia. **Associação Brasileira de Horticultura**, 2003.

MENZEL, R. Flowers through insect eyes. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 45, p. 93–101, 1997.

OKUNO, E.; CALDAS, L. I.; CHOW, C. Física para Ciências Biológicas e Biomédicas. São Paulo: **Harbra**, 1986.

ORTIZ DE BOADA, D.; COGUA, J. Reconocimiento de granos de pólen de algunas plantas melíferas em la sabana de Bogotá. **Agronomia Colombiana**, v. 6, p. 52-63, 1989.

PANIZZA, S. Plantas que curam: cheiro de mato. São Paulo: **IBRASA**, 2. ed. 279, 1997.

PEDROSA, M. W.; FONSECA, M. C. M.; SILVA, L. S.; SILVÉRIO, T. T.; Capuchinha (*Tropaeolum majus* L). **Circular técnica**, n.175, 2012.

PINTÃO, A. M.; PAIS, M. S. S.; COLY, H. In vitro antitumor activity of benzyl isothiocyanate: a natural product from *Tropaeolum majus*. **Planta Medica**, v. 61, p. 233-236, 1995.

PRICE, P. W. Species interactions and the evolution of biodiversity. In: HERRERA, C. M.; PELLMYR, O. (eds.) Plant-animal interactions: an evolutionary approach. Oxford: **Blackwell Science**, p. 3-25, 2002.

RAVEN, P. H, EVERT, R.F, EICHHORN, S.F. Biologia Vegetal, Sexta Edição, Rio de Janeiro – RJ, **Guanabara Koogan**, 2001, 906p.

RAVEN, P. H, EVERT, R. F, EICHHORN, S. E. Biologia Vegetal. Sétima Edição, Rio de Janeiro: **Guanabara-Koogan**, 2007.

RIBEIRO, W. S.; BARBOSA, J. A.; COSTA, L. C. Capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Brasília: **Editora Kiron**, 2012. 100p.

RICO-GRAY, V.; OLIVEIRA, P. S. The ecology and evolution of ant-plant interactions. Chicago: University of Chicago Press, 2007, p. 311.

ROBINSON, K. UV light reveals mating secrets of jumping spiders. **Biophotonics international**, v. 14, n. 3, p. 22-23, 2007.

RODRÍGUEZ-GIRONES, M. A.; SANTAMARIA, L. Why are so many bird flowers red? **PLoS Biology**, v. 2, p. 1515-1519, 2004.

SANTANA, M. P.; CARVALHO, C. F.; SOUZA, B.; MORGADO, L. N. Abelhas (Hymenoptera: Apoidea) visitantes das flores do feijoeiro, *Phaseolus vulgaris* L., em Lavras e Ijaci-MG. **Ciência Agroveterinária**, v. 26, n. 6, p.1119-1127, 2002.

SCHOONHOVEN, L. M.; JERMY, T.; VAN LOON, J. J. A. Insect-plant biology: from physiology to evolution. **Chapman & Hall, London**, p. 409, 1998.

SILVA, T. P. da. Fisiologia do desenvolvimento e senescência de flores de capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Tese (doutorado). Viçosa, MG, 2012. Disponível em: Acesso em: 07/07/2019.

SILVA, M. E. P. F.; MUSSURY, R. M.; VIEIRA, M. D. C.; JUNIOR, A.; VALTER, V.; PEREIRA, Z. V.; & SCALON, S. P. Floral biology of *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) and its relation with *Astylus variegatus* activity (Germar 1824) (Coleoptera: Melyridae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1251-1258, 2011.

SILVA, M. E. P. F.; MUSSURY, R. M.; SILVESTRE, R.; SCALON, S. P. Q.; BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P. Fauna visiting cultivated populations of *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). **International Journal of Science**, v. 3, 2012.

SOARES, J. L. Dicionário Etimológico e Circunstanciado de Biologia, São Paulo, Editora Scipione, 1993, 534p

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrativo para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. **Plantarum, Nova Odessa**, 2008.

SOUZA, J. P.; SOUZA, V. C. Tropaeolaceae In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M.; MELHEM, T. S.; BITTRICH, V.; KAMEYAMA, C. (eds.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, v. 2, p. 347-348, 2002.

SPAETHE, J.; TAUTZ, J.; CHITTKA, L. Visual constraints in foraging bumblebees: flower size and color affect search time and flight behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 7, p. 3898–3903, 2001.

SPEIGHT, M. R.; HUNTER, M. D.; WATT, A. D. Ecology of insects concepts and applications. **Oxford, Blackwell Science**, p. 350, 1999.

STOLTZ, H. G.; KROYMANN, J.; MITCHELL-OLDS, T. Plant-insect interactios. **Plant Biology**, v. 2, p. 268-272, 1999.

SRINIVASAN, M. V. Honeybees as a model for vision, perception, and cognition. **Annual review of entomology**, v. 55, p. 267-284, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.449-484.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 5ª ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2013. p. 954.

VON FRISCH, K. Bees: their vision, chemical senses and language. **Cornell University Press**. London. P. 154, 1976.

ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; HOELZEL, S. C. S. Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). **Iheringia**, v. 59, n. 2, p. 173-178, 2004.

WEISS, M. R. Vision and learning in some neglected pollinators: beetles, flies, moths, and butterflies. p. 171-190. In: CHITTKA, L.; THOMSON, J. D. (eds.) Cognitive ecology of pollination: animal behavior and floral evolution. Cambridge, Cambridge University Press, 2001. 344 p.

WILLMER, P. 2011. Pollination and floral ecology. Princeton University Press. 2011, 778p.

4. HIPÓTESES

A abundância de abelhas visitantes é afetada pela temperatura da corola e condições climáticas.

A cor e a fluorescência da corola afetam diretamente a abundância de abelhas visitantes.

Flores de cor vermelho não são visitadas por abelhas.

5. OBJETIVO GERAL

Verificar se existe relação entre as diferentes cores da corola de *T. majus* e a abundância de abelhas visitantes, por meio da espectroscopia óptica de fluorescência e análise das condições climáticas.

ARTIGO

O manuscrito a seguir foi estruturado seguindo as normas da Revista Biology
(Anexo I)

Article

Application of Optical Fluorescence Spectroscopy for Studying Bee Abundance in *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae)

Claudemir Antonio Garcia Fioratti ¹, Evaristo Alexandre Falcão ², Rosicleia Matias da Silva ¹, Maria do Carmo Vieira ³, Anderson Rodrigues Lima Caires ⁴ and Rosilda Mara Mussury ^{1,*}

- ¹ Laboratory of Insect-Plant Interaction, Graduate Program in Entomology and Biodiversity Conservation, College of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados-Itahum Highway, 12th km, Dourados 79804-970, MS, Brazil; claufioratti.ento@gmail.com (C.A.G.F.); rosi-matias09@hotmail.com (R.M.d.S.)
 - ² Applied Optics Group, College of Exact Sciences and Technology, Federal University of Grande Dourados, Dourados-Itahum Highway, 12th km, Dourados 79804-970, MS, Brazil; evaristofalcao@ufgd.edu.br
 - ³ Laboratory of Medicinal Plants, College of Agricultural Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados-Itahum Highway, 12th km, Dourados 79804-970, MS, Brazil; mariavieira@ufgd.edu.br
 - ⁴ Optics and Photonics Group, Institute of Physics, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, MS, Brazil; anderson.caires@ufms.br
- * Correspondence: mussuryufgd@gmail.com

Simple Summary: *Tropaeolum majus* L. is a medicinal plant popularly known as *capuchinha*. It produces flowers of different colors and hence attracts various groups of floral visitors. Since these groups may be potential pollinators, they are major for biodiversity conservation. In this regard, our study aimed to verify potential relationships between corolla colors and visiting bee abundance using optical fluorescence spectroscopy and climatic analyses. Orange and yellow flowers were the most visited and showed higher temperatures and fluorescence emissions than did flowers of other colors. This might be due to the presence of compounds such as hydroxycinnamic acid and kaempferol that emit fluorescence around 470 to 620 nm, which are within the visible spectrum for these bee species.

Abstract: *Tropaeolum majus* L. species produce flowers with all sorts of colors, from yellow to red. This work aimed to apply optical fluorescence spectroscopy to study bee abundance in *T. majus*, answering the following questions: (1) do corolla temperature and weather conditions affect the abundance of visiting bee species? (2) do flower color and corolla fluorescence affect the abundance of visiting bee species? (3) do red flowers attract more visiting bees? (4) is there a relationship between bee visits and flower compounds? The bee species *Apis mellifera*, *Paratrigona lineata*, and *Trigona spinipes* were the most observed in *T. majus* flowers. The latter was more active in the morning and preferred orange and yellow flowers. These colors also had higher temperatures and fluorescence emissions than did the red ones and those with yellow-red and orange-red nectar guides. Orange flowers emitted a broadband UV spectrum (between 475 and 800 nm). This range might be due to compounds such as hydroxycinnamic acid, flavonols, isoflavonoids, flavones, phenolic acid, and chlorophyll. Extracts from different *T. majus* corolla colors showed that flowers emit specific fluorescent signals, mainly related to bee color vision and learning, thus acting as a means of communication between bees and flowers. In this way, this information evidences the interaction between bees and *T. majus* flowers, allowing conservation actions for pollinators.

Keywords: capuchinha; floral visitor; visual perception; floral attribute; hymenoptera

Citation: Fioratti, C.A.G.; Falcao, E.A.; Silva, R.M.d.; Vieira, M.d.C.; Caires, A.R.L.; Mussury, R.M. Application of Optical Fluorescence Spectroscopy for Studying Bee Abundance in *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). *Biology* **2022**, *11*, x.

<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Natraj Krishnan

Received: 29 April 2022

Accepted: 31 May 2022

Published: 2 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Flower attributes are diverse, e.g., color, odor, shape, temperature, ultraviolet patterns, and nectar availability [1–4]. Depending on the color, light emitted from petals is one of the main attractants for floral visitors, and therefore pollinators [5]. Nectar guides can act as an optical sign to direct bees to available floral resources [6,7].

The final choice of floral visitors is driven by flower stimuli but depends only on color to thus perform foraging tasks [8–10].

Fluorescent signals emitted by flowers have specific functions and can be considered as biocommunication services between insects and plants [11–13]; that is, unlike humans, many floral visitors are sensitive to ultraviolet (UV) light emission, rather than the visible band of the spectrum [14–16].

The color vision of some insects and spectral properties of flowers has evolved into a mutualistic interaction between plants and their floral visitors, with the color vision system of bees, especially *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Apidae), being the most understood so far [17]. Since bees differentiate colors, they can better distinguish wavelengths from 400 to 500 nm, wherein the spectral sensitivity of UV, blue, and green photoreceptors overlap [18]. This behavior has also been reported in about 43 taxa from different hymenopterans, which demonstrated a trichromatic vision system with peak sensitivity at UV light (340 nm), blue light (430 nm), and green light (535 nm) [14,19].

Colors considered attractive to most bee species are those perceived by humans as bluish-violet, white, yellow, and orange. This is because the color vision spectrum of bees is within the spectral range of 340 nm to 535 nm; however, longer wavelengths such as red and infrared are barely perceived by bees, i.e., they are considered blind at wavelengths above 700 nm [15,16,19–21].

The bee vision system analyzes colors by different photoreceptors, wherein sensitivity to ultraviolet (UV) rays allows detecting and differentiating flowers emitting within this spectrum. To indicate the direction of nectar, some flowers emit fluorescent signals and/or UV radiation through nectar guides, which act as a pathway to floral resources such as nectar and pollen [15,16].

Studies on the attractiveness of fluorescence emitted by flowers to floral visitors may have originated from observations of flowers exposed to ultraviolet radiation [22]. As the association between flower color and floral visitor abundance can be explained by flower fluorescence and affected by weather conditions, our analyses aim to explain the relationship between flower fluorescence and bee visitation through the following questions: (1) do corolla temperature and weather conditions affect the abundance of visiting bee species? (2) do flower color and corolla fluorescence affect the abundance of visiting bee species? (3) do red flowers attract more visiting bees? (4) is there a relationship between bee visits and flower compounds?

Given the above, this study aimed to verify whether there is a relationship between the different *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) corolla colors and visiting bee abundance, using optical fluorescence spectroscopy and climatic analysis.

2. Materials and Methods

The experiment was carried out at the Garden of Medicinal Plants of the College of Agricultural Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil (54°56'08.5" W and 22°11'43.7" S) from August to October 2019. The local climate is classified as tropical monsoon climate (*Am*) [23].

Seeds of *Nasturtium* cv. hybrid Alta Dobrada Sortida (Isla®) that was grown comes from the seed bank from the Garden of Medicinal Plants of the College of Agricultural Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. A specimen of the studied species is deposited in the DDMS Herbarium—Dourados—MS, under number 5474. Cultivation was carried out along five 20-m long and 1-m wide

transects. During bee behavior evaluations, borders were eliminated, leaving 3 transects of 4 numbered plots (2 m long and 1 m wide) (Figure 1).

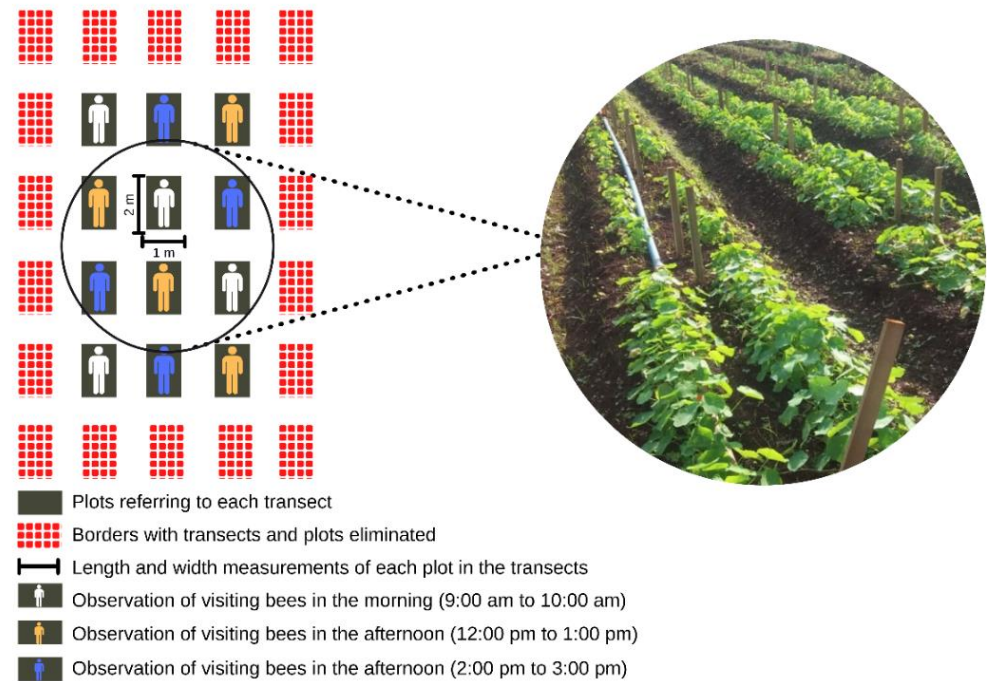


Figure 1. Experimental design of the sampling site containing the transects and plots with plants and flowers of *T. majus* and the hours of observation of the visiting bees.

2.1. Experimental Procedures

Along the transects, flowers of different corolla colors were monitored, namely: orange, orange-red, yellow, yellow-red, and red (Figure 2).



Figure 2. Corollas of *Tropaeolum majus* different colors found in transects and plots during the visit of bees. (A) Orange; (B) orange-red; (C) yellow; (D) yellow-red; (E) red.

Visiting bee foraging behavior was evaluated during visits to *T. majus* flowers. Evaluations were carried out for seven weeks, between August and October 2019. To this end, observations were made once a week for 3 h a day, one hour in the morning (9:00 a.m. to 10:00 a.m.) and two in the afternoon (12:00 p.m. to 1:00 p.m. and 2:00 p.m. to 3:00 p.m.), totaling 21 h, thus corresponding to one hour per period. Of the 12 experimental plots, four were drawn each week for a 15-min observation of bee behavior (Figure 1).

Aside from floral visitor behavior, we also evaluated corolla color and flower temperature, measured with a portable infrared thermometer (ScanTemp—Incoterm). Climatic conditions during the experiment (e.g., temperature, wind speed, and relative air humidity) were obtained from an agrometeorological station belonging to the Federal University of Grande Dourados, which is located 7 km apart from the experimental site.

The abundance of floral visitors per corolla color and visiting hours were determined by counting the number of bees, as well as sites and flower colors visited.

2.2. Pigment Extraction

Pigments were extracted from 30 *T. majus* flowers of different colors, which were collected, cut, and placed separately into Erlenmeyer flasks containing methanol p.a. at a 1:10 (*m:v*) ratio. The flasks were properly sealed with parafilm, wrapped with aluminum foil, and stored in a refrigerator for about three days. Afterward, flower extracts were obtained and diluted in methanol at a 1:1 (*v:v*) ratio for fluorescence measurements. The data obtained were compared with the literature findings to determine the compounds present in the flowers and their respective relationship with bee visits.

2.3. Fluorescence Measurements

The fluorescence of flower extracts was measured under two different experimental setups. The first consisted of obtaining better fluorescence spectra resolutions and understanding plant mechanisms involved therein. The second aimed to simulate the exposure of *T. majus* flowers to sunlight.

In the first setup, measurements were made using a portable spectrofluorometer. This equipment consists of a 405-nm diode laser, a monochromator (USB 200 FL, Ocean Optics), a Y-type fiber, and a laptop. To this end, samples were placed into a cuvette and positioned about 5 cm from excitation and detection sources. The distance was maintained for all samples. The data collected were used to draw curves representing fluorescence emission peaks divided into three regions. The first region corresponds to fluorescence emission within the range of 450 to 500 nm, the second between 500 and 635 nm, and the third between 635 and 800 nm. This experimental setup provides a better fluorescence signal because it uses a laser as a pump beam.

In the second setup, the excitation–emission matrix spectra of flower extracts were measured by using a Varian Cary Eclipse spectrophotometer, which uses a pulsed xenon lamp (80 Hz; 2- μ s pulse width at half peak height) for luminescence excitation and operates at 75 KW peak power. Samples were placed in a 10 mm optical path quartz cuvette, with all four faces polished. The samples were excited with wavelengths between 195 and 550 nm, with $\Delta\lambda$ adjusted to 5-nm steps. Emission spectra were then recorded from 450 to 750 nm in 5-nm emission intervals.

2.4. Statistical Analysis

The experiment was carried out in a completely randomized design (CRD) and $3 \times 5 \times 3$ factorial scheme (abundance of visiting bee species \times corolla colors \times observation times). The Shapiro–Wilk (W) test was used to test data normality, and when it is of non-normality, data were transformed into $\sqrt{x + 0.5}$. Results were subjected to analysis of variance (ANOVA), and means were compared by Tukey's HSD test at 5% probability using Assisat software (v. 7.6).

Visiting bee abundances were correlated with daytime weather conditions and mean floral temperatures. For this, Spearman's correlation coefficient was used with the aid of the Past software version 3.26. Spearman's coefficient correlates two quantitative variables, and values between 0.0 and 0.3 (or 0.0 and -0.3) are negligible correlations, between 0.31 and 0.5 (or -0.31 and -0.5) weak, between 0.51 and 0.7 (or -0.51 and -0.7) moderate, between 0.71 and 0.9 (or -0.71 and 0.9) strong, and >0.9 (or <-0.9) very strong. Only correlations with a statistical significance of $p \leq 0.05$ were considered.

For the preparation of scatter plots between visiting bee species and the temperature of the corollas of *T. majus*, data on the abundance of visiting bee species and the temperature averages of the different colors of the corolla of *T. majus* were used. For the scatter plots between visiting bee species and day temperature, data on the abundance of visiting bee species and day temperatures at three different times were used (9:00 a.m. to 10:00 a.m.; 12:00 p.m. to 13:00 p.m.; 14:00 p.m. to 15:00 p.m.) during the flowering weeks of *T. majus*, in order to relate the dispersion data with the data corresponding to Spearman's coefficient correlations.

3. Results and Discussion

There was no significant triple interaction between the studied factors (abundance of visiting bee species versus corolla color versus observation time) ($F = 0.81$; $DF = 16$; $p > 0.05$); however, there was a significant interaction between abundance of visiting bee species and corolla color ($F = 9.09$; $DF = 8$; $p < 0.01$) and between abundance of visiting bee species and observation time ($F = 3.13$; $DF = 4$; $p < 0.05$). A significant effect was also observed for the isolated factors, abundance of visiting bee species ($F = 107.52$; $DF = 2$; $p < 0.01$) and corolla color ($F = 46.93$; $DF = 4$; $p < 0.01$).

In total, we counted 1035 bees of the species *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) (Hymenoptera: Apidae), *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Apidae), and *Paratrigona lineata* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera: Apidae).

The abundance of the three visiting bee species of flowers varied significantly ($F = 107.52$; $DF = 2$; $p < 0.01$), and *T. spinipes* was the most abundant species along the transects (7.45 ± 0.88 a), followed by *A. mellifera* (1.89 ± 0.36 b), and *P. lineata* (0.42 ± 0.13 c). Orange (9.00 ± 1.33 a) and yellow (3.90 ± 0.71 b) flowers received more bee visits than did orange-red, yellow-red, and red flowers (1.03 ± 0.30 c; 1.16 ± 0.29 c; 1.33 ± 0.31 c, respectively) ($F = 46.93$; $DF = 4$; $p < 0.01$).

T. spinipes bees were abundant in all observed flowers, visiting orange and yellow flowers. *A. mellifera* visited orange flowers, and *P. lineata* visited orange, yellow and red flowers. Finally, *P. lineata* was less abundant. (Table 1).

Table 1. Abundance of visiting bee species in *Tropaeolum majus* flowers of different colors.

	Orange	Orange-Red	Yellow	Yellow-Red	Red
<i>Trigona spinipes</i>	19.33 ± 2.46 aA $n = 406$	2.76 ± 0.78 aC $n = 58$	9.76 ± 1.31 aB $n = 205$	2.76 ± 0.65 aC $n = 58$	2.62 ± 0.70 aC $n = 55$
<i>Apis mellifera</i>	5.67 ± 1.33 bA $n = 119$	0.29 ± 0.12 bB $n = 6$	1.71 ± 0.52 bB $n = 36$	0.67 ± 0.40 bB $n = 14$	1.10 ± 0.48 abB $n = 23$
<i>Paratrigona lineata</i>	2.00 ± 0.54 cA $n = 42$	0.05 ± 0.05 bB $n = 1$	0.24 ± 0.10 bAB $n = 5$	0.05 ± 0.05 bB $n = 1$	0.29 ± 0.12 bAB $n = 6$
CV(%)	50.57				

Means followed by the same letter do not differ statistically from each other, lowercase in the columns and uppercase in the rows, when compared by Tukey's test at 5% probability; n = number of individuals; CV = coefficients of variation.

We observed that *T. spinipes* and *A. mellifera* preferred to visit orange and yellow flowers. Results for *Byrsonima variabilis* (Malpighiaceae) were similar to ours, in which large and small bees showed greater preference for orange and yellow flowers during the collection of floral resources (pollen and nectar) [24].

T. spinipes preference for different day times for visitation showed its highest abundance, but it did not differ significantly from *P. lineata*. In turn, *A. mellifera* preferred morning hours (9:00 a.m. to 10:00 a.m.). When comparing the day times and visiting bee species, *T. spinipes* differed significantly from the others, preferring the three times for visitation (Table 2).

Table 2. Abundance of visiting bee species in *Tropaeolum majus* flowers at different day times.

	9:00 a.m.–10:00 a.m.	12:00 p.m.–1:00 p.m.	2:00 p.m.–3:00 p.m.
<i>Trigona spinipes</i>	7.03 ± 1.89 aA <i>n</i> = 246	7.97 ± 1.35 aA <i>n</i> = 279	7.34 ± 1.28 aA <i>n</i> = 257
<i>Apis mellifera</i>	3.11 ± 0.76 bA <i>n</i> = 109	1.34 ± 0.57 bB <i>n</i> = 47	1.20 ± 0.48 bB <i>n</i> = 42
<i>Paratrigona lineata</i>	0.40 ± 0.11 cA <i>n</i> = 14	0.66 ± 0.25 bA <i>n</i> = 23	0.51 ± 0.30 bA <i>n</i> = 18
CV (%)	50.57		

Means followed by the same letter do not differ statistically from each other, lowercase in the columns and uppercase in the rows, when compared by Tukey's test at 5% probability; *n* = number of individuals; CV = coefficients of variation.

Regarding visiting hours, *A. mellifera* was more active in the morning (9:00 to 10:00 a.m.), coinciding with the period of higher sugar concentrations in floral nectar [25]. Visitation periods of *A. mellifera* have already been reported in the literature, and pollen and nectar are preferably collected from 8:00 h to 10:00 h and 9:30 h to 10:30 h in the morning, respectively [26,27]. In most plant species, higher pollen concentrations and production are observed in the morning, while nectar is found in the morning and afternoon [28–31].

The highest visitation frequency in the morning is related to the greater availability of attractive substances in floral structures, given that pollinator visitation has a positive relationship with nectar production [27,32,33]. Although resource availability decreases throughout the day, bees continue to forage flowers but less intensely [34].

The correlation between the abundance of visiting bee species and mean corolla temperature during flowering weeks was positive and significant between *T. spinipes* and orange flowers (0.93; *p* = 0.00) (Figure 3A), between *A. mellifera* and orange-red and red flowers (0.96; *p* = 0.02; 0.88; *p* = 0.05) (Figure 3B), and between *P. lineata* and red flowers (0.98; *p* = 0.00) (Figure 3C), with bee abundance increasing according to flower temperature (Figure 3D–F); however, *A. mellifera* had a positive correlation only with low-temperature flowers, while *T. spinipes* and *P. lineata* had positive correlations with high-temperature flowers, mainly *T. spinipes*, which showed greater abundance in *T. majus* transects.

Bees can detect and select high-temperature flowers and thus benefit from floral rewards available [35,36]; however, when it comes to the bee visual system, flower colors play a key role in temperature changes [37]. Flowers with more intense colors absorb more heat and hence have higher temperatures; therefore, bees can learn to associate a certain flower color with its temperature, and thus color and temperature increase the efficiency of visitors in acquiring floral resources [36,38]. In comparing visiting bee abundance with weather conditions (temperature, relative humidity, and wind speed) at different times of the day during flowering, we observed a positive and significant correlation only between *T. spinipes* and temperature from 9:00 a.m. to 10:00 a.m. (0.99; *p* = 0.00) (Figure 4A); for the other species of bees, no correlation was observed for relative humidity and wind speed. On the other hand, between 12:00 p.m. and 1:00 p.m., only *T. spinipes* showed a positive and significant correlation with temperature (0.93; *p* = 0.00) (Figure 4B), relative humidity (−0.77; *p* = 0.04), and wind speed (0.80; *p* = 0.03). For the other bee species, no correlation was observed. Between 2:00 p.m. and 3:00 p.m., only *P. lineata* showed a positive and significant correlation with the climatic condition

(temperature) (0.94; $p = 0.00$) (Figure 4C); for the other bee species, no correlation was observed.

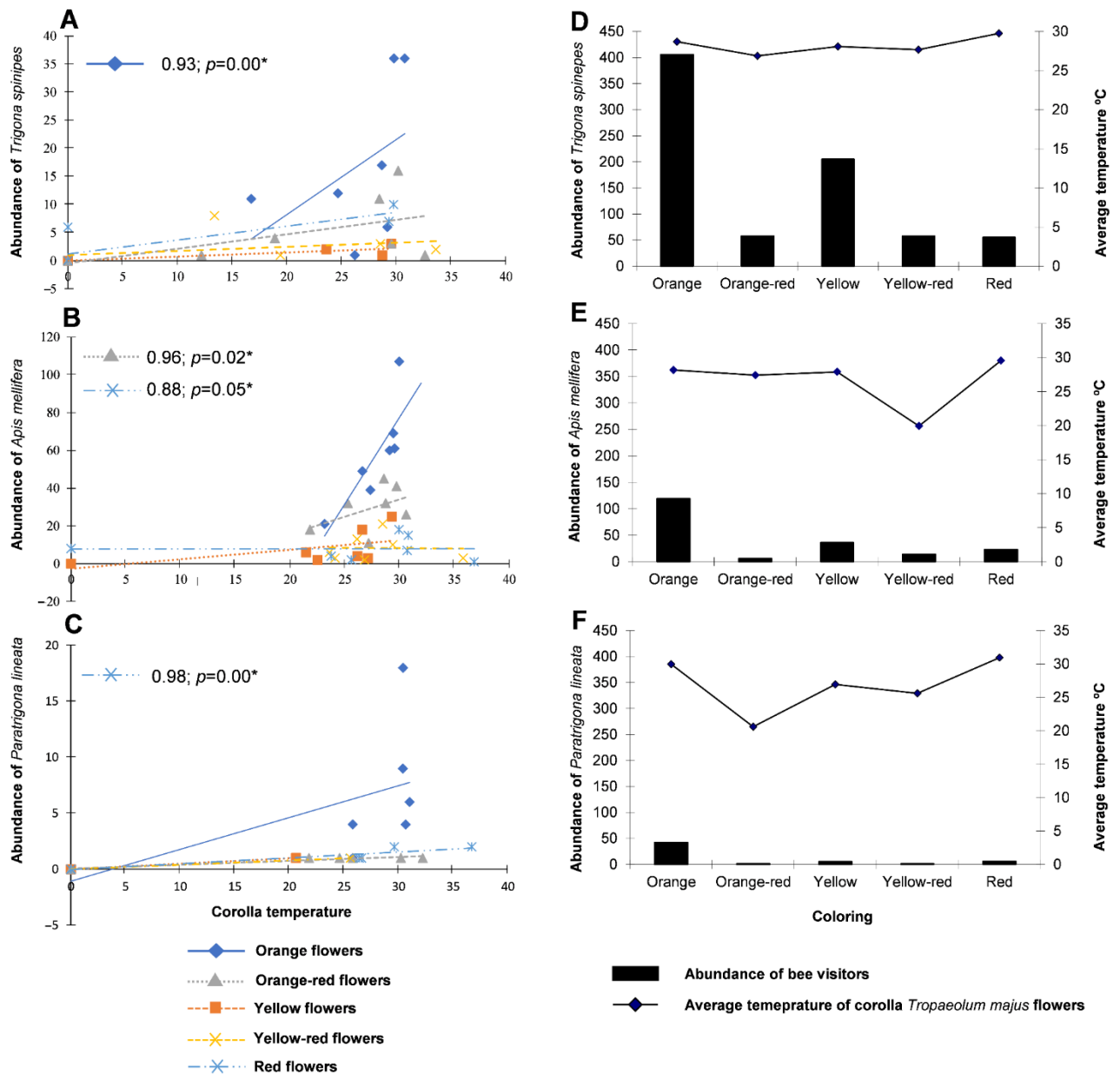


Figure 3. Dispersion corresponding to Spearman's coefficient correlations between the temperature of the *Tropaeolum majus* corolla and the abundance of *Trigona spinipes* (A), *Apis mellifera* (B), *Paratrigona lineata* (C), and the abundance of *Trigona spinipes* (D), *Apis mellifera* (E), and *Paratrigona lineata* (F) and the average temperature of the corollas of different colors of *Tropaeolum majus* flowers. * Statistical significance of spearman correlation, p -value ≤ 0.05

Given the above, we can confirm that visiting bee vision mainly uses UV light to identify flowers, sun orientation, and control flight positioning [39–41]. Furthermore, bees can adapt their vision to changes in UV emission ratio within the light spectrum [42].

Another factor influencing petal colors is secondary metabolites [43,44]. The highest flavonoid and anthocyanin contents were found in *T. majus* flowers of red color, while orange and yellow flowers had the highest carotenoid contents [45,46].

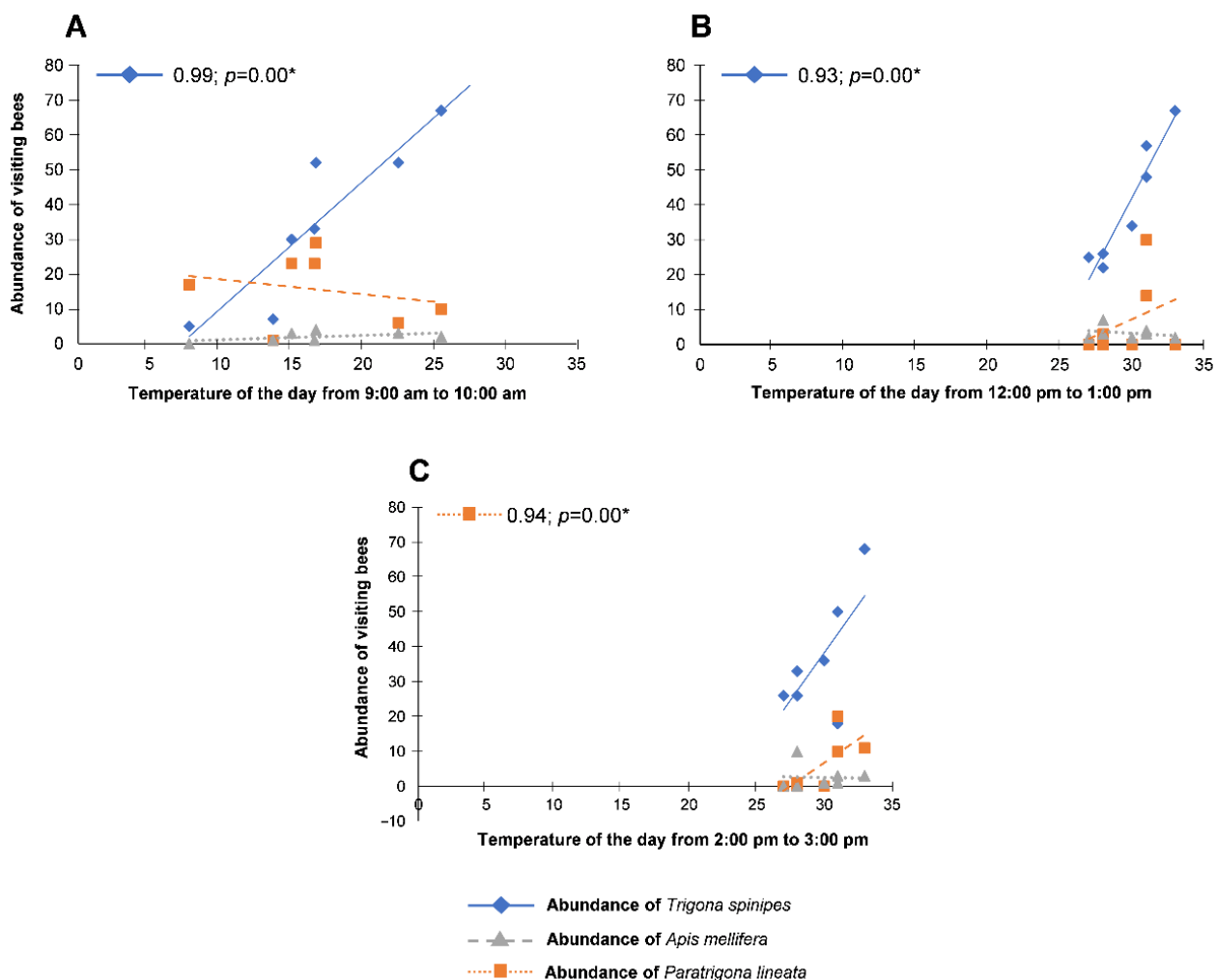


Figure 4. Dispersion corresponding to Spearman’s coefficient correlations between the abundance of visiting bee species and the temperature of the day in the three observation times, from 9:00 a.m. to 10:00 a.m. (A), 12:00 p.m. to 1:00 p.m. (B), and from 2:00 p.m. to 3:00 p.m. (C) during the seven weeks of flowering of *Tropaeolum majus*. * Statistical significance of spearman correlation, p -value ≤ 0.05 .

The contents of bioactive compounds in flowering plants, such as carotenoids, can be influenced by several abiotic factors. Of these, temperature and luminosity are paramount [47] in changes in visitation abundance, as high luminosity and high temperatures favor bee visitations [27]. At low temperatures, high-wind and low-light conditions reduce the ability of bees to fly [48,49]. These results corroborate findings in the field (Figure 3D–F), in which orange, yellow, and red *T. majus* flowers had higher temperatures and the highest bee abundances, especially the orange ones. Conversely, orange-red, and yellow-red flowers had lower temperatures and received fewer visitations (Figure 5).

The fluorescence test of *T. majus* flowers showed three intensity bands of different wavelengths (Figure 6), namely: first band (between 450 and 500 nm; Figure 6Aa, 6Ba, with a peak centered around 480 nm due to the presence of fluorophores (e.g., hydroxycinnamic acid) [50] and flavonols (e.g., myricetin, quercetin, and kaempferol) [51]; second band (between 500 and 635 nm; Figure 6Ab, 6Bb), with two peaks, one at about 528 nm and another at about 564 nm, which may be related to the presence of β -

carotene, with greater intensity compared to that of anthocyanin, respectively [52,53]; third band (Figure 6Ac, 6Bc), with two peaks, one at 670 and another at 722 nm, attributed to chlorophyll *a* and *b* fluorescence, respectively [54]. Thus, we noted that red corolla flowers have a peak at 480 nm, which is smaller than those of orange and yellow corolla flowers (Figure 6Aa), and a larger peak at 670 nm, which is attributed to chlorophyll *a* and *b* fluorescence (Figure 6Ac).

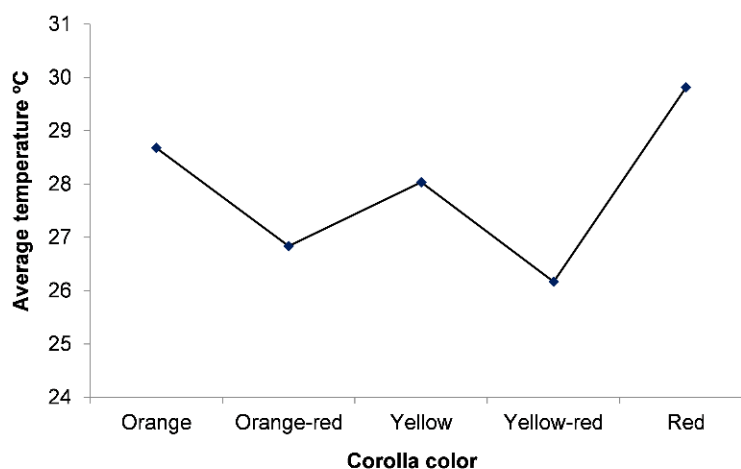


Figure 5. Corolla temperature averages of different *Tropaeolum majus* flower colors

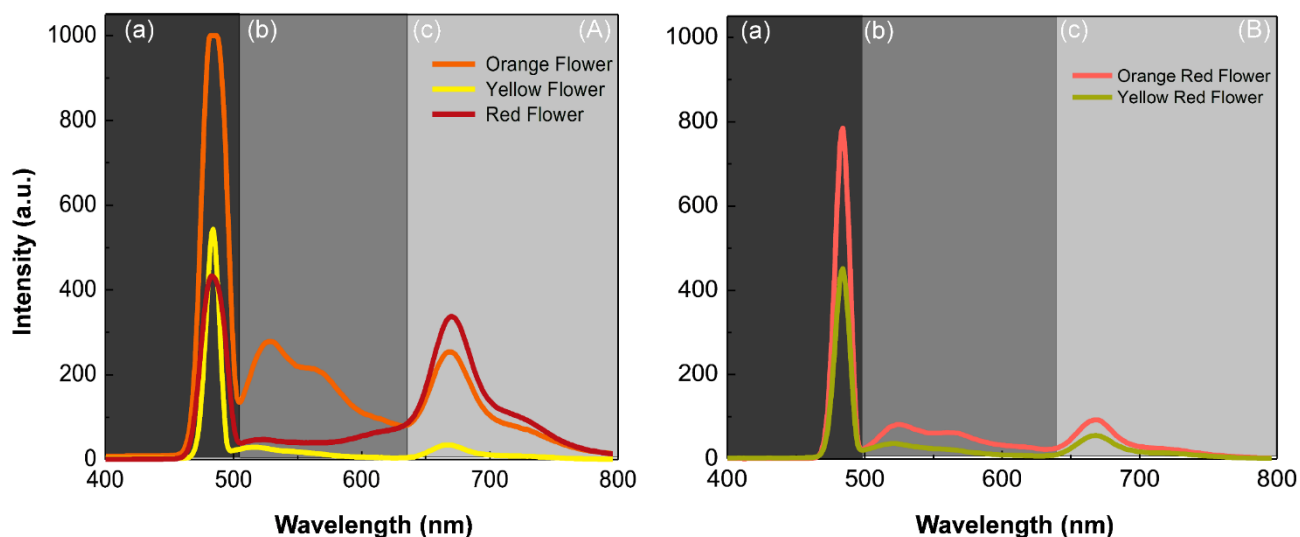


Figure 6. Fluorescence intensity (in arbitrary units, a.u.) at different wavelengths of orange, yellow and red corolla flowers (A), nectar-guided flowers (orange-red and yellow-red) (B) of *Tropaeolum majus*. Fluorescence intensity corresponding to fluorophores and flavonols (A(a), B(a)—black); β -carotene and anthocyanin (A(b), B(b)—dark gray); and chlorophyll (A(c), B(c)—light gray).

Orange corolla flowers showed a broad fluorescence band from 475 to 800 nm (Figure 6A). We found that, between 400 and 600 nm, fluorescence was due to the presence of compounds such as hydroxycinnamic acid, flavonols, isoflavonoids, flavones, and phenolic acid, while between 600 and 800 nm, it was due to chlorophyll [54]. As most of these compounds are present in *T. majus* flowers, the fluorescence spectrum pattern (Figure 6) agrees with their contents [50,51]. Orange flowers of *T. majus* have the largest amounts of kaempferol, followed by red and yellow ones [51]. Among the flavonols in paprika samples, kaempferol had the highest fluorescence intensity at

excitation, around 405 nm, whereas quercetin and myricetin had much lower intensities [55]; therefore, the fluorescence of the region (a) in Figure 6 is determined by kaempferol in orange and red flower extract samples, greater in orange than in red flowers. The spectrum in this region of yellow flowers, which had the least amount of these flavonols, was determined by their largest amount of hydroxycinnamic acid.

Since all fluorescence measurements were made under similar experimental conditions, such as concentrations and sample-detector distance, one can see in Figure 6A,B that orange *T. majus* flowers had the highest intensity for the three analyzed bands.

To represent *T. majus* flower extract spectra varying excitation and emission, the experimental results were presented up to 650 nm, aiming to encompass only the eyesight of bees (Figure 7). This is because many insects, especially bees, have a trichromatic vision system [56]; that is, they prefer colors with fluorescence emission between 320 and 650 nm [15,16,21,56,57].

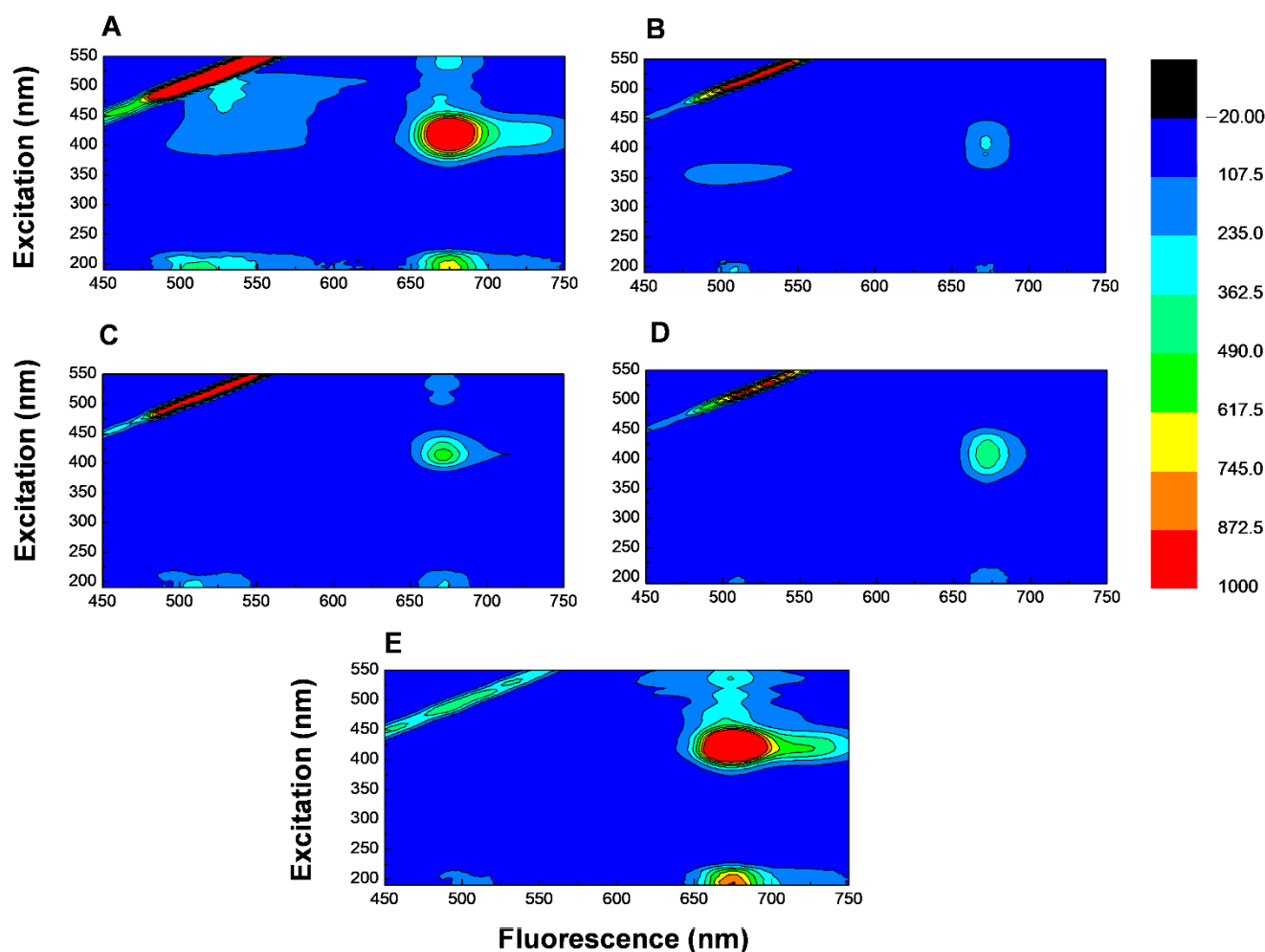


Figure 7. Excitation–emission matrix spectra of *Tropaeolum majus* flower extracts in orange (A), yellow (B), orange-red (C), yellow-red (D), and red (E) colors.

Among the flowers observed, the orange and yellow ones received a greater abundance of insects, and hence relevant fluorescence emissions from 470 to 620 nm (7A, B), which is due to carotenoids such as β -carotene [52,53] that absorb UV light in the blue band (430 nm) and emit yellow (580 nm), orange (600 nm), and red (700 nm) wavelengths [12,58]. Once hymenopterans are trichromatic, yellow-colored surfaces are more visible and contrast with vegetation green background [56], thus highlighting bee preference for orange and yellow *T. majus* flowers for visitation.

The least preferred flowers by bees were the orange-red and yellow-red ones (7C, D), showing low fluorescence emissions for carotenoids (around 480 to 540 nm) and high emissions for chlorophyll (around 650 and 720 nm). Red flowers (7E) showed low fluorescence emission between 480 and 520 nm and higher emissions between 620 and 750 nm, with the band between 600 and 800 nm being due to chlorophyll [54], which absorb UV light in the blue (430 nm) and red (700 nm) bands and emit green wavelengths (535 nm) [59,60].

Bees do not have a red-light receptor in the 700 nm band because their vision is restricted to short wavelengths between UV (300 nm) and orange (690 nm), while red and infrared (IR) are in a spectral range above 700 nm [36], explaining the low bee visits in these flowers. Thus, the green fluorescence color emitted by red *T. majus* flowers resembles green foliage dispersed in the environment, as leaves also present a chlorophyll compound with green fluorescence emission [19,24,56]; therefore, red corolla flowers were not in evidence, explaining the low bee visit abundances in orange-red, yellow-red, and especially red flowers, which had higher emissions. It is noteworthy that the odor exhaled by *T. majus* stamens attracts pollinators, serving as a cue to find these unattractive flowers [25].

Our results support the hypothesis that flower fluorescence measurements indicate UV wavelength emissions, which stimulate insect eye photoreceptors [61]. They also prove that bees visit fewer red flowers due to their higher emissions (above 700 nm) and high chlorophyll fluorescence index in this band. Furthermore, our outcomes suggest that flower fluorescence pattern is an important signal in flower recognition by visiting bees [15,16,24,61]; therefore, our findings raise new possibilities in the perception of floral visitors since fluorescence was not considered important in attracting bees to different *T. majus* flowers.

As a future perspective, further studies are needed to measure the fluorescence of nectar and pollen, as well as their relationship with floral reward availability and attraction of visiting bees to different *T. majus* flower colors.

4. Conclusions

Corolla fluorescence affects the abundance of visiting bee species, with orange and yellow flowers being the most visited by bees due to their higher temperature and fluorescence emission compared to red, yellow-red, and orange-red flowers. Climatic conditions also affect visitation by bees but depend on daytime and bee species. There is a relationship between visits by bees and floral compounds since orange-red flowers have kaempferol and yellow ones have less of these flavonols, and their spectrum is determined by a greater amount of hydroxycinnamic acid. Although visited, the red flowers must appear black to the bees, as the light emitted by them is beyond the spectral range of the bees, above 700 nm.

Author Contributions: Conceptualization, C.A.G.F. and R.M.M.; methodology, C.A.G.F., R.M.d.S., E.A.F., M.d.C.V. and R.M.M.; formal analysis, C.A.G.F., R.M.d.S. and R.M.M.; investigation, C.A.G.F., R.M.d.S., E.A.F. and R.M.M.; resources, C.A.G.F. and R.M.M.; data curation, C.A.G.F., R.M.d.S. and R.M.M.; writing—original draft preparation, C.A.G.F., R.M.d.S., E.A.F., M.d.C.V., A.R.L.C. and R.M.M.; writing—review and editing, C.A.G.F., R.M.d.S., E.A.F., M.d.C.V., A.R.L.C. and R.M.M.; visualization, C.A.G.F. and R.M.M.; supervision, C.A.G.F., E.A.F. and R.M.M.; project administration, C.A.G.F. and R.M.M.; funding acquisition, E.A.F. and R.M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: We would like to thank the National Council for the Improvement of Higher Education, Brazil (CAPES), for providing a scholarship to the first author. CNPQ (process: 483683/2010-8, 208232/2014-1), FINEP (contract: 04.13.0448.00/2013). This study was supported by the Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors are thankful to the Brazilian Agencies, CAPES for the scholarship to the first author, FUNDECT (Foundation to Support the Development of Teaching, Science and Technology of the State of Mato Grosso do Sul), for the financial support of this work.

Conflicts of Interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Dyer, A.G.; Whitney, H.M.; Arnold, S.E.; Glover, B.J.; Chittka, L. Mutations perturbing petal cell shape and anthocyanin synthesis influence bumblebee perception of *Antirrhinum majus* flower colour. *Arthropod Plant Interact.* **2007**, *1*, 45–55. <https://doi.org/10.1007/s11829-007-9002-7>.
2. Whitney, H.M.; Kolle, M.; Andrew, P.; Chittka, L.; Steiner, U.; Blover, B.J. Floral iridescence, produced by diffractive optics, acts as a cue for animal pollinators. *Science* **2009**, *323*, 130–133. <https://doi.org/10.1126/science.1166256>.
3. Leonard, A.S.; Dornhaus, A.; Papaj, D.R. Flowers help bees cope with uncertainty: Signal detection and the function of floral complexity. *J. Exp. Biol.* **2011**, *214*, 113–121. <https://doi.org/10.1242/jeb.047407>.
4. Ding, B.; Mou, F.; Sun, W.; Chen, S.; Peng, F.; Bradshaw, H.D.; Yuan, Y.W. A dominant-negative actin mutation alters corolla tube width and pollinator visitation in *Mimulus lewisii*. *New Phytol.* **2017**, *2013*, 1936–1944. <https://doi.org/10.1111/nph.14281>.
5. Gandía-Herrero, F.; Garcia-Carmona, F.; Escribano, J. Floral fluorescence effect. *Nature* **2005**, *437*, 334. <https://doi.org/10.1038/437334a>.
6. Thorp, R.W.; Briggs, D.L.; Estes, J.R.; Erickson, E.H. Nectar fluorescence under ultraviolet irradiation. *Science* **1975**, *189*, 476–478. <https://doi.org/10.1126/science.189.4201.476>.
7. Davies, K.L.; Stpiczynska, M.; Gregg, A. Nectar-secreting floral stomata in *Maxillaria anceps* Ames & C. Schweinf. (Orchidaceae). *Ann. Bot.* **2005**, *96*, 217–227. <https://doi.org/10.1093/aob/mci182>.
8. Dafni, A.; Bernhardt, P.; Shmida, A.; Ivri, Y.; Greenbaum, S.; O'Toole, C.; Losito, L. Red bowl-shaped flowers: Convergence for beetle pollination in the Mediterranean region. *Isr. J. Plant Sci.* **1990**, *39*, 81–92. <https://doi.org/10.1080/0021213X.1990.10677134>.
9. Ômura, H.; Honda, K. Priority of color over scent during flower visitation by adult *Vanessa indica* butterflies. *Oecologia Aust.* **2005**, *142*, 588–596. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1761-6>.
10. Dötterl, S.; Glück, U.; Jürgens, A.; Woodring, J.; Aas, G. Floral reward, advertisement and attractiveness to honey bees in dioecious *Salix Caprea*. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e93421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093421>.
11. Arnold, K.E.; Owens, I.P.F.; Marshall, N.J. Fluorescent signaling in parrots. *Science* **2002**, *295*, 92–92. <https://doi.org/10.1126/science.295.5552.92>.
12. Lim, M.L.M.; Land, M.F.; Li, D. Sex-specific UV and fluorescence signals in jumping spiders. *Science* **2007**, *315*, 481. <https://doi.org/10.1126/science.1134254>.
13. Andrews, K.; Reed, S.M.; Masta, S.E. Spiders fluoresce variably across many taxa. *Biol. Lett.* **2007**, *3*, 265–267. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0016>.
14. Briscoe, A.D.; Chittka, L. The evolution of color vision in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **2001**, *46*, 471–510. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.471>.
15. Srinivasan, M.V. Honey bees as a model for vision, perception, and cognition. *Annu. Rev. Entomol.* **2010**, *55*, 267–284. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.010908.164537>.
16. Ibarra, N.H.; Vorobyev, M.; Menzel, R. Mechanisms, functions and ecology of colour vision in the honeybee. *J. Comp. Physiol. A* **2014**, *200*, 411–433. <https://doi.org/10.1007/s00359-014-0915-1>.
17. Dyer, A.G.; Garcia, J.E.; Shrestha, M.; Lunau, K. Seeing in colour: A hundred years of studies on bee vision since the work of the Nobel laureate Karl von Frisch. *Proc. R. Soc. Vic.* **2015**, *127*, 66–72. <https://doi.org/10.1071/RS15006>.
18. Von Helversen, O. Zur spektralen Unterschiedsempfindlichkeit der Honigbiene. *J. Comp. Physiol. A* **1972**, *80*, 439–472. <https://doi.org/10.1007/BF00696438>.
19. Peitsch, D.; Fietz, A.; Hertel, H.; Souza, J.; Ventura, D.F.; Menzel, R. The spectral input systems of hymenopteran insects and their receptor-based colour vision. *J. Comp. Physiol. A* **1992**, *170*, 23–40. <https://doi.org/10.1007/BF00190398>.
20. Von Frisch, K. *Bees: Their Vision, Chemical Senses and Language*; Cornell University Press: London, UK, 1976; p. 154.

21. Menzel, R.; Backhaus, W. Colour vision in insects. In *Vision and Visual Dysfunction*; Gouras, P., Eds., MacMillan: London, UK, 1991; pp. 262–293.
22. Iriel, A.; Lagorio, M.G. Is the flower fluorescence relevant in biocommunication? *Sci. Nat.* **2010**, *97*, 915–9240. <https://doi.org/10.1007/s00114-010-0709-4>.
23. Alvares, C.L.; Stape, J.L.; Sentelhas, P.C.; Gonçalves, J.L.M.; Sparovek, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Z.* **2013**, *22*, 711–728. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.
24. Melo, B.T.; Mota, T.; Schlindwein, C.; Antonini, Y.; Oliveira, R. Floral colour change in *Byrsonima variabilis* (Malpighiaceae) as a visual cue for pollen but not oil foraging by oil-collecting bees. *Sci. Nat.* **2018**, *105*, 46. <https://doi.org/10.1007/s00114-018-1572-y>.
25. Silva, M.E.P.F.; Mussury, R.M.; Silvestre, R.; Scaloni, S.P.Q.; Braga, L.F.; Sousa, M.P. The entomology fauna visiting cultivated populations of *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). *Int. J. Sci.* **2012**, *3*, 538–545.
26. Malerbo-Souza, D.T.; Tasinafo, R.H. Sazonalidade das abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. *Cien. Cult.* **2012**, *8*, 49–54.
27. Barbosa, B.C.; Paschoalini, M.; Maciel, T.T.; Prezoto, F. Visitantes florais e seus padrões temporais de atividade em flores de *Dombeya wallichii* (Lindl.) K. Schum (Malvaceae). *Entomotropica* **2016**, *31*, 131–136.
28. Malerbo-Souza, D.T.; de Toledo, V.D.A.A.; Couto, L.A.; Nogueira-Couto, R.H. Uso da tela excludora de rainha no alvado e seus efeitos na atividade de coleta e no desenvolvimento de colônias de *Apis Mellifera*. *Acta Sci. Anim. Sci.* **1998**, *20*, 383–386. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v20i0.4406>.
29. Hilário, S.D.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Kleinert, A. Flight activity and colony strength in the stingless bee *Melipona bicolor* (Apidae, Meliponinae). *Rev. Bras. Biol.* **2000**, *60*, 299–306. <https://doi.org/10.1590/S0034-71082000000200014>.
30. Moreti, A.C.C.C.; Marchini, L.C.; Souza, V.C.; Rodrigues, R.R. *Atlas do Pólen de Plantas Apícolas*; Editora Papel Virtual: Rio de Janeiro, Brazil, 2002; p. 93.
31. Pierrot, L.M.; Schlindwein, C. Variation in daily flight activity and foraging patterns in colonies of urucu-*Melipona scutellaris* Latreille (Apidae, Meliponini). *Rev. Bras. Zool.* **2003**, *20*, 565–571. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752003000400001>.
32. Pleasants, J.M. Bumblebee response to variation in nectar availability. *Ecology* **1981**, *62*, 1648–1661. <https://doi.org/10.2307/1941519>.
33. Real, L.A.; Rathcke, B.J. Individual variation in nectar production and its effect on fitness in *Kalmia latifolia*. *Ecology* **1991**, *82*, 149–155. <https://doi.org/10.2307/1938910>.
34. Lorenzon, M.C.A.; Matrangolo, C.A.R.; Schoereder, J.H. Flora visitada pelas abelhas eussociais (Hymenoptera, Apidae) na Serra da Capivara, em Caatinga do Sul do Piauí. *Neotrop. Entomol.* **2003**, *32*, 27–36. <https://doi.org/10.1590/S1519-566x2003000100004>.
35. Ruedenauer, F.A.; Spaethe, J.; Leonhardt, S.D. How to know which food is good for you: Bumblebees use taste to discriminate between different concentrations of food differing in nutrient content. *J. Exp. Biol.* **2015**, *218*, 2233–2240. <https://doi.org/10.1242/jeb.118554>.
36. Van der Kooij, C.J.; Kevan, P.G.; Koski, M.H. The thermal ecology of flower. *Ann. Bot.* **2019**, *124*, 343–353. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz073>.
37. Chittka, L.; Menzel, R. The evolutionary adaptation of flower colours and the insect pollinators' colour vision. *J. Comp. Physiol. A* **1992**, *171*, 171–181. <https://doi.org/10.1007/BF00188925>.
38. Dyer, A.G.; Whitney, H.M.; Arnold, S.E.; Glover, B.J.; Chittka, L. Bees associate warmth with floral colour. *Nature* **2006**, *442*, 525–525. <https://doi.org/10.1038/442525a>.
39. Blacquière, T.; Van der Aa-Furnée, J.; Cornelissen, B.; Donders, J.N.L.C. Behaviour of honey bees and bumble bees beneath three different greenhouse claddings. *Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet.* **2006**, *17*, 93–102.
40. Morandin, L.A.; Laverty, T.M.; Gegear, R.J.; Kevan, P.G. Effect of greenhouse polyethylene covering on activity level and photoresponse of bumble bees. *Can. Entomol.* **2002**, *134*, 539–549. <https://doi.org/10.4039/Ent134539-4>.
41. Reis, M. Podem as abelhas resolver o problema causado pelo excesso de néctar na framboesa? *Rev. Tec. Cien. Agríc.* **2019**, 5–7.
42. Dyer, A.G.; Chittka, L. Bumblebee search time without ultraviolet light. *J. Exp. Biol. A* **2004**, *207*, 1683–1688. <https://doi.org/10.1242/jeb.00941>.
43. Dey, P.M.; Harborne, J.B. *Plant Biochemistry*; Editora Academic Press: London, UK, 1997.
44. Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. *Biologia Vegetal*, 7th ed.; Editora Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro, Brazil, 2007.

45. Costa, L.C.; Ribeiro, W.S.; Barbosa, J.A. Compostos bioativos e alegações de potencial antioxidante de flores de maracujá, cravo amarelo, rosa e capuchinha. *Rev. Bras. Prod. Agroindus.* **2014**, *16*, 279–289.
46. Gonçalves, J.; Silva, G.C.O.; Carlos, L.A. Compostos bioativos em flores comestíveis. *Persp. Online Biol. Saúde* **2019**, *9*, 11–20. <https://doi.org/10.25242/886892920191719>.
47. Qian, H.; Liu, T.; Deng, M.; Miao, H.; Cai, C.; Shen, W. Effects of light quality on main health-promoting compounds and antioxidant capacity of Chinese kale sprouts. *Food Chem.* **2016**, *196*, 1232–1238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.055>.
48. Burrill, R.M.; Dietz, A. The response of honey bees to variations in solar radiation and temperature. *Apidologie* **1981**, *12*, 319–328.
49. Morato, E.F.; Campos, L.A.D.O. Partição de recursos florais de espécies de *Sida* Linnaeus e *Malvastrum coromandelianum* (Linnaeus) Garcke (Malvaceae) entre *Cephalurgus anomalus* Moure & Oliveira (Hymenoptera, Andrenidae, Panurginae) e *Melissoptila cnecomala* (Moure) (Hymenoptera, Apidae, Eucerini). *Rev. Bras. Zool.* **2000**, *17*, 705–727. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752000000300016>.
50. Putschögl, M.; Zirak, P.; Penzkofer, A. Absorption and emission behaviour of trans-p-coumaric acid in aqueous solutions and some organic solvents. *J. Chem. Phys.* **2008**, *343*, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2007.10.031>.
51. Garzón, G.A.; Manns, D.C.; Riedl, K.; Schwartz, S.J.; Padilla-Zakour, O. Identification of phenolic compounds in petals of nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*) by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry and determination of oxygen radical absorbance capacity (ORAC). *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 1803–1811. <https://doi.org/10.1021/jf503366c>.
52. Cherry, R.J.; Chapman, D.; Langelaar, J. Fluorescence and phosphorescence of β -carotene. *Trans. Faraday Soc.* **1968**, *64*, 2304–2307. <https://doi.org/10.1039/TF9686402304>.
53. Drabent, R.; Pliszka, B.; Olszewska, T. Fluorescence properties of plant anthocyanin pigments. I. Fluorescence of anthocyanins in *Brassica oleracea* L. extracts. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1999**, *50*, 53–58. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(99\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(99)00070-6).
54. Falco, W.F.; Botero, E.R.; Falcão, E.A.; Santiago, E.F.; Bagnato, V.S.; Caires, A.R.L. In vivo observation of chlorophyll fluorescence quenching induced by gold nanoparticle. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2011**, *225*, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2011.09.027>.
55. Monago-Maraña, O.; Durán-Merás, I.; Galeano-Díaz, T.; de la Peña, A.M. Fluorescence properties of flavonoid compounds. Quantification in paprika samples using spectrofluorimetry coupled to second order chemometric tools. *Food Chem.* **2016**, *196*, 1058–1065. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.041>.
56. Chittka, L.; Shmida, A.; Troje, N.; Menzel, R. Ultraviolet as a component of flower reflections, and the colour perception of Hymenoptera. *Vis. Res.* **1994**, *34*, 1489–1508. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(94\)90151-1](https://doi.org/10.1016/0042-6989(94)90151-1).
57. Reverté, S.; Retana, J.; Gómez, J.M.; Bosch, J. Pollinators show flower colour preferences but flowers with similar colours do not attract similar pollinators. *Ann. Bot.* **2016**, *118*, 249–257. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw103>.
58. Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*, 3th ed.; Editora Artmed: Porto Alegre, Brazil, 2004; pp. 449–484.
59. Claro, P.R. Cores de outono. *Rev. Ciência Elem.* **2019**, *7*, 38. <http://doi.org/10.24927/rce2019.038>.
60. Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*, 5th ed.; Editora Artmed: Porto Alegre, Brazil, 2013; p. 954.
61. Brito, V.L.G.; Telles, F.; Lunau, K. Ecologia cognitiva da polinização. In *Biologia da Polinização*; Rech, A.R., Agostini, K., Oliveira, P.E.A.M., Machado, I.C., Eds.; Editora Projeto Cultural: Rio de Janeiro, Brazil, 2014;