

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

FLÁVIA SANTOS VIEIRA NOVAES

**Diversidade da Flora Apícola em uma região do Bioma Pampa: Uma
Abordagem Integrada entre Palinologia e DNA metabarcoding**

**São Gabriel
2025**

FLÁVIA SANTOS VIEIRA NOVAES

**Diversidade da Flora Apícola em uma região do Bioma Pampa: Uma
Abordagem Integrada entre Palinologia e DNA metabarcoding**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

**São Gabriel
2025**

FLÁVIA SANTOS VIEIRA NOVAES

**Diversidade da Flora Apícola em uma região do Bioma Pampa: Uma
Abordagem Integrada entre Palinologia e DNA metabarcoding**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Ciências Biológicas

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 30 de abril de 2025

Banca examinadora:

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo
Orientador
UNIPAMPA

Prof. Dr. Rubem Samuel de Avila Junior
UNIPAMPA

Prof.^a Dra. Maria Gabriela Tamaño
UTEC

N935d Novaes, Flávia Santos Vieira

Diversidade da flora apícola em uma região do bioma Pampa:
uma abordagem integrada entre palinologia e DNA metabarcoding
/ Flávia Santos Vieira Novaes.

78 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2025.

"Orientação: Andrés Delgado Cañedo".

1. Apis mellifera. 2. Apicultura. 3. Palinologia. 4. DNA
metabarcoding. I. Título.

AGRADECIMENTO

A Deus e ao Orixás, pelos caminhos que foram abertos...

Aos meus pais, por serem como são, por acreditarem tanto em mim e, principalmente, porque, em sua simplicidade, me ensinam sobre uma grandeza imensurável...

Aos meus três irmãos, porque seguimos juntos nessa caminhada e a realização de um é a alegria de todos...

Ao meu companheiro, por todos os momentos compartilhados, pelo constante apoio e incentivo, pelo amor, pela confiança e pela parceria diária...

Ao meu orientador, pela oportunidade concedida, pela paciência e generosidade ao ensinar, e pelo contagiante entusiasmo em todos os momentos de trabalho...

Aos meus amigos, antigos e novos, que me inspiram de diversas formas, e sem os quais a jornada teria sido mais dura...

Agradeço também por todo suporte fornecido pela UNIPAMPA, pela CAPES e pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, que tornaram possível o desenvolvimento da minha pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que, de diferentes maneiras, estiveram comigo ao longo dessa trajetória...

“Agora não pergunto mais pra onde vai a estrada
Agora não espero mais aquela madrugada
Vai ser, vai ser, vai ter de ser, vai ser, faça amolada
O brilho cego de paixão e fé, faça amolada”

Milton Nascimento

RESUMO

A apicultura é uma atividade agropecuária de grande relevância e com reconhecido papel socioeconômico, sociocultural e socioambiental. Além da produção de produtos como mel, própolis e cera, as abelhas desempenham um serviço ecossistêmico crucial: a polinização de cultivos agrícolas e de ambientes naturais. No Brasil, essa prática tem crescido cada vez mais, com destaque para o Rio Grande do Sul, que segue entre os principais estados produtores de mel há mais de uma década. Contudo, apesar da importância reconhecida das abelhas, as dinâmicas predatórias de uso da terra, com a ampla supressão da vegetação nativa, representam uma ameaça constante à saúde e à sobrevivência desses polinizadores. Neste contexto, estudar a flora nativa utilizada por abelhas é um passo essencial para o planejamento de práticas apícolas sustentáveis, que favoreçam a saúde dos polinizadores e a conservação vegetal nas áreas de produção. Com este objetivo, o presente estudo investigou, por meio da análise do pólen apícola, quais são as espécies nativas de uma região do Bioma Pampa brasileiro com potencial para compor áreas de apicultura e como ocorre a distribuição de suas floradas ao longo do ano. Foram realizadas coletas quinzenais de pólen corbicular em quatro colmeias ao longo de um ano (novembro de 2023 a outubro de 2024), bem como de plantas férteis no entorno do apiário. A partir do pólen das flores coletadas foi elaborado o laminário palinológico de referência. A identificação do pólen corbicular foi realizada através do método padrão de análise palinológica de lâminas com material acetolisado e, alternativamente, análise molecular por meio da técnica de DNA metabarcoding. Além disso, foi avaliada a abundância e a riqueza das espécies ao longo dos meses. Após um ano de coletas, foram detectadas 58 plantas forrageadas por *Apis mellifera*, das quais 46 foram identificadas à nível de espécie, sendo 33 nativas. Os dados de abundância e riqueza apresentaram variações significativas ao longo do ano, com os maiores valores concentrados entre os meses de agosto e dezembro, seguidos de um pico em março. Os tipos polínicos de destaque foram: *Eugenia uniflora*, *Eucalyptus* sp., *Senecio brasiliensis* e *Solidago chilensis*. Com relação ao resultado do metabarcoding, observou-se uma maior sobreposição com os dados da palinologia quando a análise foi feita contra uma biblioteca preparada a partir das análises palinológicas. Os resultados indicam que a análise palinológica ainda é o método mais confiável para detectar a origem botânica de produtos oriundos de regiões cuja diversidade genética

da vegetação não está totalmente representada em bancos de dados. A diversidade de plantas nativas do Bioma Pampa brasileiro utilizadas por *A. mellifera* evidencia seu potencial para suprir a forragem apícola. Estes dados contribuem tanto para a palinologia das espécies apícolas quanto para complementar estudos de conservação ambiental, além de auxiliar o desenvolvimento de estratégias de manejo da apicultura sustentável na região.

Palavras-Chave: *Apis mellifera*, apicultura, palinologia, DNA metabarcoding.

ABSTRACT

Beekeeping is a highly relevant agricultural activity with a recognized socio-economic, socio-cultural and socio-environmental role. In addition to producing products such as honey, propolis and wax, bees perform a crucial ecosystem service: pollination of agricultural crops and natural environments. In Brazil, this practice has been growing more and more, especially in Rio Grande do Sul, which has been one of the main honey-producing states for more than a decade. However, despite the recognized importance of bees, the predatory dynamics of land use, with the widespread suppression of native vegetation, represent a constant threat to the health and survival of these pollinators. In this context, studying the native flora used by bees is an essential step towards planning sustainable beekeeping practices that favor pollinator health and plant conservation in production areas. To this purpose, this study investigated, by analyzing bee pollen, which native species in a region of the Brazilian Pampa Biome have the potential to be used in beekeeping areas and how their flowers are distributed throughout the year. Corbicular pollen was collected every two weeks from four hives over the course of a year (November 2023 to October 2024), as well as from fertile plants around the apiary. The reference palynological laminarium was drawn up from the pollen collected from the flowers. The corbicular pollen was identified through palynological analysis of slides with acetolyzed material and molecular analysis using the DNA-metabarcoding technique. In addition, the abundance and richness of species over the months was assessed. After a year of collecting, 58 plants foraged by *Apis mellifera* were detected, of which 46 were identified to species level, 33 of which were native. The abundance and richness data showed significant variations throughout the year, with the highest values concentrated in the months of August to December, followed by a peak in March. The most common pollen types were *Eugenia uniflora*, *Eucalyptus* sp., *Senecio brasiliensis* and *Solidago chilensis*. With regard to the metabarcoding results, there was a greater overlap with the palynology data when the analysis was carried out against a library prepared from these results. The results indicate that palynological analysis is still the most reliable method for detecting the botanical origin of products from regions where the genetic diversity of the vegetation is not fully represented in databases. The diversity of native plants from the Brazilian Pampa Biome used by *Apis mellifera* shows their potential to

supply bee forage. These data contribute both to the palynology of bee species and to complementing environmental conservation studies, as well as aiding the development of sustainable beekeeping management strategies in the region.

Keywords: *Apis mellifera*, beekeeping, palynology, DNA-metabarcoding.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Figura 1- Registros fotográficos de *Apis mellifera* coletando pólen de diferentes espécies.....21
- Figura 2-** Ilustração do grão de pólen de *Phrygilanthus acutifolius* (R. & P.) Eichl. subsp. *eugenioides* (H.B.K.) Rizz, com destaque para suas estruturas.....23
- Figura 3-** Registro de algumas das espécies visitadas por *Apis mellifera*64

LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO

Figure 1- General abundance of the identified pollen types over the 12 months of sampling.....	41
Figure 2- Richness of identified pollen types over the 12 months os sampling.....	42
Figure 3- Distribution chart of pollen types over the months, with variation in color and size according to abundance.....	43
Figure 4- Photomicrographs of the pollen types found in the apicutural pollen collected in the Brazilian Pampa Biome.....	46
Figure 5- Photomicrographs of the pollen types found in the apicutural pollen collected in the Brazilian Pampa Biome.....	47
Figure 6- Photomicrographs of the pollen types found in the apicutural pollen collected in the Brazilian Pampa Biome.....	48
Figure 7- Photomicrographs of the pollen types found in the apicutural pollen collected in the Brazilian Pampa Biome.....	49
Figure 8- Photomicrographs of the pollen types found in the apicutural pollen collected in the Brazilian Pampa Biome.....	50
Figure 9- Taxonomy assignment of corbicular pollen from an apiary in the Brazilian Pampa Biome using metabarcoding analysis.....	52
Supplementary Figure 1- KRONA Diagrams Illustrating Taxonomy Assignments of ITS Reads from Corbicular Pollen Metabarcoding in a Pampa Biome Apiary.....	72
Supplementary Figure 2- Cladogram Based on taxonomical assigns of ITS Regions Showing OTUs Identified by Kraken from a Preliminary Corbicular Pollen Metabarcoding Analysis in a Pampa Biome Apiary.....	73

LISTA DE TABELA DO MANUSCRITO

Table 1- Pollen types found in bee pollen collected in the Brazilian Pampa Biome between November 2023 and October 2024, along with their respective life forms and origins.....	36
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Apicultura	15
1.1.2 Produtos Apícolas	16
2.1.3 Apicultura no Brasil	17
1.2 Flora Apícola e Polinização	19
1.2.1 Identificação da Flora Apícola	21
1.2.2 Palinologia	22
1.2.3 DNA metabarcoding	24
2 OBJETIVOS	26
3 MANUSCRITO	27
Abstract	30
Introduction	31
Materials and Methods	33
Results and Discussion	36
Conclusion	56
Bibliography	57
4 INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES	63
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
6 REFERÊNCIAS	66
7 MATERIAL SUPLEMETAR.....	73

1 INTRODUÇÃO

A população mundial enfrenta uma crise socioambiental sem precedentes, com previsões catastróficas que exigem grandes intervenções, tais como o desenvolvimento de estratégias para mitigar a degradação e supressão das áreas de vegetação nativa em todo o planeta, diretamente atrelada ao amplo declínio da biodiversidade mundial (Brondízio et al., 2019). Tal crise é, em grande parte, decorrente de décadas de uma mercantilização industrial dos múltiplos setores econômicos que, impulsionada pelo grande capital hegemônico e seus modos de produção e consumo vigentes, se desenvolveu de maneira predatória em relação ao meio ambiente, comprometendo seu equilíbrio e oferta de recursos ecossistêmicos essenciais, (Vieira, Junior e Zanon et al., 202; Marques, 2022).

No Brasil, a degradação ambiental é um tema recorrente, e o Pampa se destaca como o bioma com a menor proporção de áreas protegidas por unidades de conservação (Trevisan et al., 2020). Em paralelo, é também o bioma que sofreu a maior perda proporcional de vegetação nativa nos últimos 36 anos, com a supressão de 3,4 milhões de hectares dessa vegetação entre 1985 e 2021, conforme dados do MapBiomas (2022).

A ampla degradação e descaracterização das paisagens do Pampa está fortemente relacionada ao uso ambientalmente negligente do mesmo, com uma vasta expansão de grandes áreas de monocultura, especialmente de soja e silvicultura, além da pecuária extensiva, desenvolvida em pastagens compostas por espécies exóticas (Trevisan et al, 2020). Neste contexto, destaca-se a urgência do desenvolvimento de estratégias de conservação que promovam a transição das práticas de manejo ostensivo e socioambientalmente degradantes da agropecuária vigente, para modelos mais sustentáveis e agroecológicos (Aguiar e Werner, 2022).

Dentre as atividades agropecuárias desenvolvidas no referido bioma, a apicultura, criação racional de abelhas melíferas do gênero *Apis*, se configura como uma prática de grande relevância, visto que se reconhece um amplo potencial ecológico, econômico e de desenvolvimento social atrelado à mesma, por possibilitar a geração de renda em concomitância com a preservação da biodiversidade nas áreas de produção (Wolff, 2018).

Portanto, este estudo se estruturou dada a importância da apicultura, e a

possibilidade de fazer dessa atividade um meio de promoção da preservação da biodiversidade vegetal em suas áreas de desenvolvimento. O objetivo da pesquisa foi determinar, por meio da identificação do pólen coletado pelas abelhas, quais são as espécies vegetais presentes em uma área localizada no domínio fitogeográfico do Pampa brasileiro são relevantes para o pasto apícola, bem como entender a disponibilidade temporal das diferentes fontes de recursos florais. Dessa forma, visa favorecer o desenvolvimento socioambiental da região e fornecer ferramentas para o planejamento de áreas de produção agroecológicas.

1.1 Apicultura

A criação de abelhas para o consumo de seus produtos é uma prática que remonta à antiguidade, tendo se iniciado há, aproximadamente, 2.400 anos a.C. pelos povos egípcios, em colmeias construídas a partir de uma mistura de barro e palha (Kritsky, 2017; Pereira et al., 2023). Mesmo antes do desenvolvimento das primeiras técnicas de manejo de abelhas, os produtos da colmeia já eram consumidos quando encontrados, havendo, inclusive, registros de artefatos construídos a partir da cera com datação muito anterior às primeiras evidências de apicultura propriamente dita (Kritsky, 2017).

Os primeiros registros de interação dos humanos com as abelhas retratam o consumo do mel e cera de colmeias encontradas, muitas vezes culminando na destruição das colônias (Halvaci et al., 2024). O início da apicultura propriamente dita é marcado pelo momento em que as colônias passaram a ser criadas, eliminando a necessidade de caçar o mel e evitando a morte da colmeia durante a coleta de seus produtos. Desde o seu início até os tempos atuais, essa prática já se desenvolveu isoladamente de múltiplas formas distintas e nas mais variadas regiões do mundo (Kritsky, 2017).

No decorrer do tempo, a prática apícola foi se aprimorando cada vez mais, com a criação de colmeias artificiais cada vez mais elaboradas, o desenvolvimento de técnicas cada vez mais eficientes de extração do mel, além do acúmulo de informações acerca do ciclo de vida e do comportamento das abelhas (Gupta et al., 2014). De acordo com os referidos autores, a criação da colmeia com estrutura móvel e autoespaçada desenvolvida por L.L. Langstroth por volta de 1850 é considerada uma das principais invenções ao longo desse percurso, assim como a base de cera

pré-fabricada que auxilia e poupa energia das abelhas. Além destas, muitas outras inovações surgiram e surgem até hoje com o intuito melhorar as condições de trabalho e otimizar a produção.

Atualmente, a apicultura é uma prática global e multifacetada, que vai desde a extração dos produtos da colmeia até a polinização de culturas agrícolas (Martinho et al., 2022). Embora a comercialização dos produtos apícolas ainda seja o seu foco principal, é crescente o reconhecimento e interesse pelo serviço de polinização desempenhado pelas abelhas (Etxegarai-Legarreta e Sanchez-Famoso, 2022; Papa et al., 2022), do qual dependem tanto sistemas agrícolas quanto ambientes naturais (Khalifa et al., 2021).

Trata-se de uma atividade amplamente defendida como propulsora de benefícios multissistêmicos, pois gera empregos diretos e indiretos, contribui para o desenvolvimento rural sustentável, além de atuar na promoção da sustentabilidade (Etxegarai-Legarreta e Sanchez-Famoso, 2022). O conjunto de bens e serviços gerados pela apicultura são traduzidos pelos autores acima como um sistema complexo de três dimensões inte-relacionadas e em constante transformação, sendo estas: a dimensão sociocultural, socioambiental e socioeconômica, não devendo esta última se sobrepor às demais em hipótese alguma.

Cabe ressaltar que, apesar dos comprovados benefícios oriundos da apicultura, essa atividade se desenvolve a partir da criação de uma espécie exótica mantida em alta densidade. Neste contexto, estudos evidenciam que a presença de *Apis mellifera* L. pode trazer impactos negativos para espécies de polinizadores nativos, sobretudo pela competição por recursos e locais de nidificação, além de influenciar nas dinâmicas de interação planta-polinizador em ecossistemas naturais (Herrera, 2020). Tais efeitos podem ser potencializados ou mitigados a depender do grau de sobreposição de nicho, da densidade populacional das abelhas manejadas e selvagens, bem como da disponibilidade de recursos (Mallinger, Gaynes-Day e Grantton, 2017). Diante disso, é essencial que a apicultura seja conduzida de forma consciente, com pleno reconhecimento de seus potenciais impactos ecológicos e da necessidade de adoção de estratégias que conciliem a produção com a conservação da biodiversidade em suas áreas de desenvolvimento (Oddie e Dahle, 2024).

1.1.2 Produtos apícolas

Além do mel, da colmeia também se pode extrair uma gama de outros produtos, como: a cera, elaborada pelas abelhas por meio de suas glândulas cerígenas e utilizada na construção dos favos; a própolis, elaborada a partir de resinas coletadas em árvores, acrescidas de cera, pólen ácidos e gorduras, sendo utilizada para isolar, proteger e higienizar a colmeia; a geleia real, substância secretada pelas glândulas hipofaríngeas das abelhas jovens, utilizada para a nutrição das larvas das operárias e zangões até o terceiro dia de vida e da rainha durante toda a sua existência; a apitoxina, veneno natural das abelhas, utilizado em casos de ameaça; o pólen apícola, que é o pólen coletado das flores, acrescido de néctar e substâncias salivares e moldado em alvéolos para ser levado à colmeia; o pão de abelha, principal fonte proteica das abelhas, elaborada a partir do pólen apícola acrescido de mel e armazenado em favos onde é fermentado por bactérias lácticas (Nordi 2014) .

Estes produtos apresentam uma infinidade de aplicações e vêm ganhando cada vez mais espaço e notoriedade no mercado global, especialmente em indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas (Dantas et al., 2024). Em virtude do crescente interesse pelo consumo de alimentos naturais e terapias alternativas, a apiterapia, que consiste no uso terapêutico de produtos apícolas, tem conquistado espaço e aumentado a busca por estes produtos em diversos países (Nordi 2014; Bava et al 2024). Isso se dá em razão da sua composição com propriedades nutracêuticas e farmacológicas, rica em compostos bioativos que podem conferir ações anti-inflamatória, antibacteriana, antioxidante, imunomoduladora, pró-apoptóticas, antiproliferativas, antimetastáticas e cicatrizante (Bava et al., 2024).

Como mencionado anteriormente, são múltiplos os usos e benefícios gerados pelos produtos extraídos das colmeias, indo desde a produção de alimentos e medicamentos, até a elaboração de cosméticos, velas, impermeabilizantes, dentre outros (Nordi, 2014; Bava et al 2024; Dantas et al., 2024). Essa gama de possibilidades reforça a importância da apicultura do ponto de vista socioeconômico e sociocultural, e como tal, é fundamental que seja realizada de modo sustentável e ético, com a retirada moderada de produtos, sempre respeitando as necessidades

das abelhas, seus ciclos naturais de vida, os limites da colmeia e do ambiente onde estão inseridas (Baumung et al., 2021; Velardi et al., 2021).

1.1.3 Apicultura no Brasil

O início da apicultura no Brasil se deu por volta de 1839, quando o padre Antônio Carneiro veio ao país trazendo colônias de *Apis mellifera mellifera* de Portugal, as abelhas européias. Por falta da adaptação às condições climáticas e por não serem tão resistentes, a produção de mel da época era muito baixa e muitas colônias se perderam para algumas doenças. Por tais razões, em 1956 rainhas da subespécie africana *Apis mellifera scutellata* foram trazidas para o Brasil para fins de estudos, onde, por acidente, conseguiram escapar e cruzar com as abelhas europeias presentes na região, resultando em descendentes poli-híbridos conhecidos como abelhas africanizadas (Gorroi, 2020; Pereira et al., 2023).

Diversos fatores contribuíram para que a abelha africanizada rapidamente se expandisse pelo Brasil, como sua fácil adaptação a diferentes condições ambientais, sua maior resistência a doenças, sua alta capacidade reprodutiva, maior frequência de enxameação e abandono de ninho, além do seu comportamento defensivo, razão pela qual muitos acidentes ocorreram na época, fazendo com que a apicultura brasileira entrasse em colapso (Gorroi, 2020). Com o passar do tempo, pesquisadores em parceria com apicultores desenvolveram diversas estratégias de adaptação das técnicas tradicionais de manejo, para tornar possível o trabalho com uma espécie tão defensiva, e foi então que a apicultura voltou a se restabelecer no país (Pereira et al., 2023).

Somadas aos atributos das abelhas africanizadas, a diversidade vegetal encontrada no Brasil e seu clima favorável garantem ao país condições ideais para o desenvolvimento dessa atividade (Almeida, 2024). Como reflexo disso, no ranking mundial de produção de mel o Brasil ocupa a 11 posição, tendo atingido o próprio recorde em 2023, com mais de 64 mil toneladas produzidas (Silva e Barbalho, 2024).

No território nacional a atividade apícola é conduzida, em sua maioria, por pequenos produtores, que veem nela uma oportunidade de complementar a renda familiar (Silva e Barbalho, 2024). Estima-se que cerca de 350 mil brasileiros tenham na apicultura uma fonte direta de renda, e quase o triplo de pessoas possuam indiretamente alguma renda ligada a essa cadeia produtiva (Almeida, 2024). Dentre

os Estados brasileiros, o Rio Grande do Sul se destaca na produção apícola há mais de uma década, com uma prática essencialmente desenvolvida em pequena e média escala, complementando a agricultura familiar em pequenas propriedades rurais e colaborando com o aumento da renda e a fixação dessas famílias no campo (Wolff, 2018).

Além da venda dos produtos da colmeia, a apicultura no Brasil também está fortemente atrelada à produção agrícola, por meio da polinização de culturas. Diversos animais atuam como polinizadores e são essenciais do ponto de vista dessa produção, de modo que, ao menos 60% de todos os tipos de culturas são dependentes desse serviço em diferentes níveis (Lopes et al., 2021). Dentre os polinizadores, as abelhas predominam, sendo as principais responsáveis pela polinização de culturas, contribuindo efetivamente para o aumento da produção e qualidade de frutos e sementes (Lopes et al., 2021; Santos, Otesbelgue e Blochtein, 2021).

Tratando-se especificamente de *Apis mellifera*, estima-se que aproximadamente R\$ 65 bilhões dos lucros da produção atual do país estejam atrelados ao seu serviço de polinização (Pereira, 2023). O reconhecido sucesso dessa espécie se deve, em grande parte, ao fato de ser a mais utilizada em processos de polinização dirigida de cultivos comerciais. A preferência por essas abelhas é decorrente de uma série de fatores, tais como sua alta densidade populacional, seu hábito generalista na coleta de recursos, seu fácil manejo, e sua ampla distribuição geográfica (Da Silva e Júnior, 2022).

Apesar dos comprovados benefícios econômicos que apicultores e produtores rurais podem obter a partir dessa parceria, o Brasil segue inserido em uma cadeia produtiva marcada pelo uso excessivo de pesticidas, o que ameaça diretamente a saúde dos polinizadores, tornando tais ambientes inúmeras vezes inapropriados para a apicultura (Santos, Otesbelgue e Blochtein, 2021).

1.2 Flora Apícola e polinização

A flora apícola de uma região, também conhecida como pasto apícola, é caracterizada pelo conjunto de plantas ali presentes que oferecem recursos atrativos para as abelhas. As espécies que compõem essa flora podem ser nectaríferas,

quando fornecem exclusivamente néctar, poliníferas, quando fornecem exclusivamente pólen, ou nectaríferas-poliníferas quando fornecem ambos (Almeida et al., 2003). Tanto o pólen quanto o néctar são recursos essenciais para a vida das abelhas, dos quais obtêm seus nutrientes e se derivam todos os alimentos produzidos na colmeia (Diniz, Rêgo, Almeida Jr., 2020).

Quando coletam pólen, as abelhas o armazenam em suas corbículas – estruturas localizadas no terceiro par de pernas – após ser compactado com néctar e saliva e moldado em alvéolos, formando uma unidade de carga denominada pólen apícola, pellet ou pelota, que será levada para a colmeia (Lopes et al., 2022). Exceto em condições de escassez de alimentos, pólen oriundo de diferentes espécies não são misturados na mesma carga, cuja cor, forma e tamanho vai depender tanto da espécie de origem, quanto do néctar utilizado no momento da coleta (Barth et al., 2009). Por se tratar da sua principal fonte proteica, o consumo de pólen é fundamental para o desenvolvimento, saúde e longevidade desses indivíduos (Di Pasquale et al, 2016).

Mesmo quando saem para coletar néctar, em suas visitas florais, as abelhas ficam com os seus corpos recobertos com os grãos de pólen das flores por onde passou. Esse processo permite que, ao se deslocarem para outras flores, acabem transferindo involuntariamente o pólen para seus estigmas, facilitando o processo de fertilização e polinização cruzada em muitas dessas plantas (Papa et al., 2022).

A capacidade de polinizar variadas espécies se deve ao seu hábito alimentar generalista. Sendo assim, para suprir suas necessidades nutricionais, as abelhas da espécie *A. mellifera* visitam uma grande diversidade de flores, com as mais variadas cores e formatos (Tamame e Muiño, 2024). Porém, o grau de importância de uma determinada espécie vegetal, do ponto de vista apícola, vai depender da sua abundância, da duração de sua floração, além da quantidade e composição do recurso ofertado (Almeida et al., 2003). Já a produção de tais recursos é influenciada por um conjunto de características ambientais, tais como radiação solar, temperatura, umidade do solo e do ar, altitude e frequência de chuvas. Em razão dessas condições, a flora apícola vai apresentar características muito particulares a depender da região em que se encontra e do período do ano (Santos, Kill e Araújo, 2006).

Dessa forma, a diversidade de espécies vegetais que compõem a área está

diretamente relacionada à qualidade do pasto apícola, uma vez que o perfil nutricional dos recursos ofertados varia de uma espécie para outra (Malagnini, 2022). É comprovada a importância de uma oferta diversificada de flores na garantia de uma nutrição equilibrada para as abelhas, refletindo diretamente em diversos aspectos da sua saúde e, conseqüentemente, na qualidade da sua produção (Di Pasquale et al., 2016; Filipiak et al., 2017). Além disso, a diversidade de flores nas áreas de produção aumenta o volume de alimentos disponíveis, o que prolonga o calendário floral, tornando prescindível tanto a alimentação artificial quanto a apicultura migratória (Oddie; Dahle, 2024).

Além da disponibilidade e qualidade dos recursos alimentares, outros fatores influenciam na saúde das abelhas, afetando diretamente sua capacidade de produção e de prestação de serviços ecossistêmicos, tais como o clima, o manejo do ambiente onde vivem, e a presença de resíduos químicos em suas áreas de forrageio (Di Pasquale et al., 2013; Olate-Olave et al., 2021). Por tais razões, as principais ameaças que os polinizadores enfrentam são comuns para ambos os grupos, selvagens e geridos, sendo a destruição ou fragmentação de habitats e o uso de pesticidas as ameaças mais urgentes, e razões mais significativas da perda de biodiversidade (Kovacs-Hostyanszki, 2017; Caro et al., 2022; Oddie e Dahle, 2024).

Nesse contexto, o investimento na diversificação vegetal com foco em espécies nativas é um ponto indispensável no planejamento de áreas de produção apícola sustentáveis, pois além de auxiliar no desenvolvimento das abelhas melíferas de interesse, é fundamental do ponto de vista da conservação das espécies de polinizadores nativos, garantindo que suas necessidades nutricionais também sejam supridas (Oddie e Dahle, 2024; Mramba, 2025).

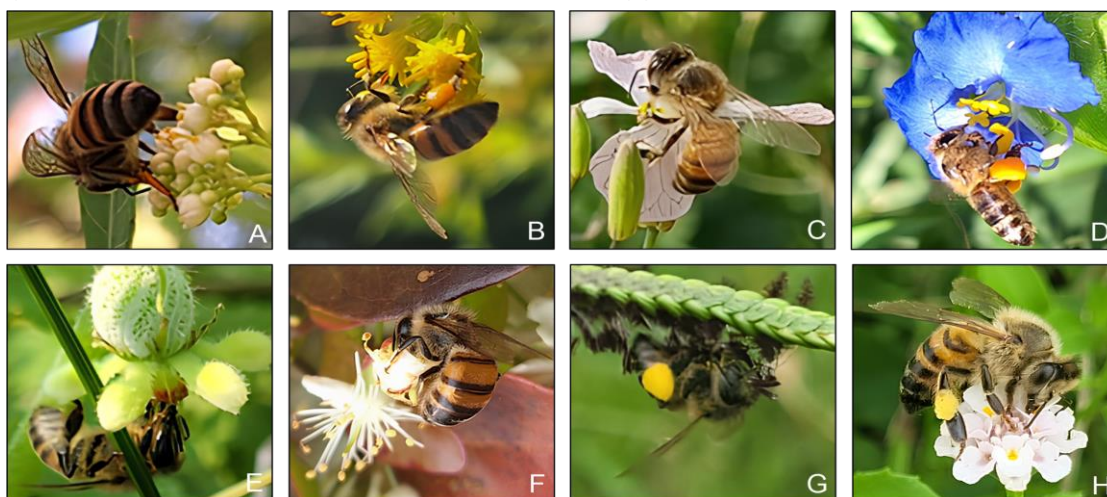
1.2.1 Identificação da Flora Apícola

A partir da identificação do pólen coletado pelas abelhas é possível determinar quais espécies da composição florística local são forrageadas (Borges, Silva e Nascimento, 2021), e entender como ocorre sua distribuição ao longo das estações.

Tal conhecimento pode ser adquirido tanto por meio de observações diretas do forrageio (Figura 1), quanto através de investigações acerca da origem botânica dos produtos da colmeia. Atualmente, essas investigações podem se valer de

diferentes métodos, tais como as tradicionais análises palinológicas ou mesmo o sequenciamento do material genético dos grãos de pólen contidos nos produtos apícolas (Richardson et al., 2015; Borges, Silva e Nascimento, 2021).

Figura 1- Registros fotográficos de *Apis mellifera* coletando pólen de diferentes espécies: (A) *Schinus terebinthifolia* Raddi. (B) *Solidago chilensis* Meyen (C) *Raphanus sativus* L. (D) *Commelina erecta* L. (E) *Blumenbachia* sp. Schrad. (F) *Eugenia uniflora* L. (G) *Paspalum notatum* Flügge (H) *Phyla nodiflora* L.



Fonte: Autoria própria

Independente do método utilizado, o conhecimento da flora apícola de uma região é fundamental tanto para otimizar as ações de manejo no apiário, como para promover a preservação das espécies nativas de plantas e demais polinizadores que compõem a área, constituindo, assim, um sistema de produção de base ecológica (Reis et al., 2023; Singh et al, 2024).

1.2.2 Palinologia

O termo 'palinologia' foi inicialmente criado em 1945 pelos pesquisadores Hyde e Williams para designar um ramo da botânica que se dedicava ao estudo dos grãos de pólen e esporos, sua dispersão e suas aplicações. Posteriormente, em 1952, Erdtman definiu a palinologia como a ciência que estuda os grãos de pólen e esporos, baseando-se em sua parede externa e não em seu interior vivo (Domingues e Bitar, 2014). O avanço dessa ciência se deu em paralelo ao avanço da microscopia e ao desenvolvimento de métodos de tratamento polínico para sua melhor observação (Salgado-Labouriau, 1973).

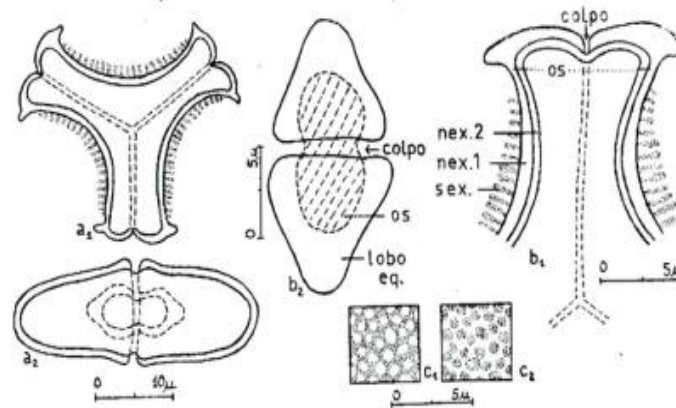
Atualmente a palinologia é uma ciência que se dedica ao estudo de

palinomorfos fósseis e atuais, sendo estes os grãos de pólen e esporos das plantas ou cistos de algas, dinoflagelados, foraminíferos, além de outros palinomorfos encontrados em matéria orgânica de sedimentos (Correia, Francisco e Peruquetti, 2017) São múltiplos os seus campos de aplicação, abrangendo áreas como a geopalinologia, no estudo dos sedimentos; a aeropalinologia, nos estudos dos grãos de pólen presentes na atmosfera; Melissopalinologia, em estudos do pólen contido no mel; paleopalinologia, que estuda os palinomorfos fósseis encontrados em rochas; palinotaxonomia, que consiste na identificação e descrição taxonômica dos grãos; palinologia forense e entomopalinologia. (Lima-Ribeiro e Barbieri, 2005).

No contexto das análises de produtos apícolas, a melissopalinologia é um dos campos de aplicação da palinologia que visa determinar a origem dos grãos de pólen contidos em sedimentos de amostra de mel, pois estes constituem um indicador da origem botânica e geográfica do produto (Barth, 2009). Além da análise do mel, a origem botânica dos demais produtos da colmeia também pode ser igualmente determinada por meio da identificação dos seus grãos de pólen, que podem passar por diferentes tratamentos para sua posterior avaliação morfológica (Doreto, 2019).

Os grãos de pólen são estruturas microscópicas complexas que carregam o gameta masculino das flores, possuindo uma imensa variabilidade morfológica (Correia, Francisco e Peruquetti, 2017). Essas células possuem grande resistência em virtude da composição da camada externa de sua parede celular, a exina, formada por esporopolenina, um polímero altamente estável, resistente e elástico. A exina se divide em sexina (geralmente apresenta esculturas) e nexina (não esculturada) que, por sua vez, se divide em nexina um e dois. Já a camada mais interna da parede do grão se chama intina e é composta por celulose (Figura 2) (Domingues e Bitar, 2014).

Figura 2- Ilustração do grão de pólen de *Phrygilanthus acutifolius* (r. & P.) Eichl. subsp. *eugenioides* (H.B.K.) Rizz, com destaque para suas estruturas. Em b1 se observa a exina e suas partes: sex. (sexina), nex.1 (nexina 1) e nex.2 (nexina 2).



Fonte: Barth e Misumi, 2023

As análises dos grãos de pólen envolvem, na maioria dos casos, o processo de fossilização artificial proposto por Erdtman em 1960, conhecido como acetólise. Esse método consiste na remoção do conteúdo interno do grão por meio de uma hidrólise ácida, o que facilita a visualização dos detalhes da exina (Gasparino e Cruz-Barros, 2006).

Embora a acetólise seja o método mais utilizado, alguns grãos não resistem a esse tratamento e se desfazem. Nesses casos, geralmente se recorre a métodos que utilizam substâncias menos agressivas, e que não removem completamente a intina e o conteúdo interno dos grãos (Domingues e Bitar, 2014). Outra alternativa é a observação "in natura" utilizada por Barth (1989) que mantém o pólen intacto, porém, dificulta a análise mais detalhada das morfologias polínicas.

O conjunto de caracteres morfológicos encontrados nestas células que permitem sua identificação incluem seus tipos de abertura, sua estrutura, a escultura da sua parede externa, sua unidade polínica, seu formato e tamanho, além disso é possível avaliar se são isolados, como na maioria das espécies, ou agrupados. A depender da quantidade de grãos, é possível encontrar díades (dois), tétrades (quatro), políades (mais de quatro) ou mássulas, quando são muitos grãos fundidos (Gasparino e Cruz-Barros, 2006; Domingues e Bitar, 2014).

Quanto maior a quantidade de caracteres morfológicos analisados, maior é o grau de precisão na identificação do pólen, sendo possível, a depender do conjunto de informações, chegar até o nível de espécie (Correia, Francisco e Peruquetti, 2017). No entanto, a identificação dos grãos de pólen ocorre, mais facilmente, à nível de família, de modo que nem sempre é possível determinar a espécie de origem

(Barth, 1989). Isso pode ocorrer, por exemplo, em virtude da pouca ou nenhuma variabilidade morfológica que grãos de pólen de grupos estenopolínicos podem apresentar. Nestes casos, o pólen oriundo de diferentes espécies ou gêneros pode possuir aspectos muito semelhantes, com uma sobreposição morfológica que dificulta sua diferenciação (Gasparino e Cruz-Barros, 2006). Por esta razão, conhecer a flora de origem é uma estratégia interessante no contexto das análises palinológicas de produtos apícolas, sendo possível correlacionar as informações para a obtenção de resultados mais precisos.

Embora a palinologia seja uma ferramenta importantíssima para detecção da origem botânica de produtos apícolas, a necessidade de um conhecimento especializado somada ao tempo necessário para a análise fez com que novos métodos fossem utilizados para tais finalidades, dentre eles, a análise molecular por meio da técnica de DNA metabarcoding (Richardson et al., 2015).

1.2.3 DNA-metabarcoding

DNA metabarcoding é um termo que se refere à técnica molecular de identificação de diferentes espécies contidas em uma amostra a partir da amplificação e sequenciamento de regiões específicas do DNA desses organismos (Simão, 2016). Trata-se de uma ferramenta poderosa cuja aplicação se dá em diferentes campos, como estudos de conservação e avaliação da biodiversidade, monitoramento de dinâmicas ecológicas, ou mesmo para detectar a origem vegetal e a procedência de determinados produtos (Liu et al., 2019; Oliveira et al., 2023; Daugaliyeva et al., 2024)

Quando aplicada no contexto de identificação da origem botânica dos produtos apícolas, diferente das análises palinológicas cujo conteúdo interno do grão é dispensado e o resultado se dá através do exame visual da morfologia polínica, as análises por meio de DNA metabarcoding dependem justamente do conteúdo interno destas células.

A técnica utiliza marcadores universais presentes em regiões conservadas do genoma dos organismos de interesse que possuem pouca variação dentro da mesma espécie e muita variação em indivíduos de espécies diferentes (Wizenberg et al., 2023). No caso das plantas, a região geralmente utilizada como marcador genético é a ITS2 (internal transcribed spacer 2) do DNA ribossômico, em razão da sua comprovada variabilidade interespecífica (Chiara et al., 2021; Wizenberg et al.,

2023).

De modo geral, o processo se inicia com a extração do DNA da amostra, seguida pela amplificação de regiões de interesse específicas por meio da técnica de PCR, após a qual se realiza o sequenciamento genético, e as sequências obtidas são analisadas com o auxílio de ferramentas de bioinformática (Bell et al., 2016). Deste modo, ao comparar as sequências resultantes do sequenciamento, com bancos de dados contendo sequências de referência que foram geradas a partir da mesma região genômica de diversas espécies, é possível identificar quais destas estavam contidas na amostra inicial (Chiara et al., 2021).

A principal vantagem atribuída ao seu uso se deve ao curto período de tempo em que se pode identificar múltiplas espécies de uma amostra, o que otimiza trabalhos de identificação em larga escala (Daugaliyeva et al., 2024). Por outro lado, o maior desafio diz respeito à ausência de bancos de dados contendo a diversidade genética da vegetação de diferentes regiões, o que impossibilita identificações mais precisas, gerando, por vezes, resultados contendo falsos negativos ou falsos positivos (Smart, 2017; Bell et al., 2019; Ullah et al., 2024).

Devido às limitações ainda presentes nas análises de produtos apícolas por meio do DNA metabarcoding, Daugaliyeva e colaboradores (2024) recomendam que esses estudos sejam realizados paralelamente às análises palinológicas, enquanto novas pesquisas devem se desenvolver com foco na expansão e criação de bancos de dados genéticos cada vez mais completos, visando preencher essa lacuna existente na análise molecular de grãos de pólen.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar quais espécies vegetais do Pampa brasileiro, localizado no município de São Gabriel– RS, contribuem para o pasto apícola, bem como entender a disponibilidade temporal dessas diferentes fontes de recursos florais.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar o pólen corbicular coletado ao longo de um ano por meio de análises palinológicas
2. Identificar o pólen coletado por meio do DNA metabarcoding, para complementar as análises palinológicas e comparar os métodos.
3. Analisar a variação temporal da flora apícola ao longo do ano, identificando os padrões sazonais de oferta floral.
4. Elaborar um laminário palinológico de referência das espécies coletadas na área de estudo.

3 MANUSCRITO

Os resultados obtidos a partir desta pesquisa serão apresentados sob a forma de manuscrito. O manuscrito está disposto em formato de artigo científico e foi submetido no periódico “Applied Vegetation Science” (ISSN: 1654-109X).

Unveiling Floral Diversity in the Brazilian Pampa Biome: A Palynological and Metabarcoding Approach to *Apis mellifera* Forage Resources

Authors:

Flavia Santos Vieira Novaes¹, Angelo Alberto Schneider², Geferson Fernando Metz³, Rafael Plá Matielo Lemos³, Filipe de Carvalho Victoria³, Andrés Delgado Cañedo¹.

Filiation:

¹ Grupo de Pesquisa e Extensão em Apicultura do Pampa, Federal University of Pampa, Aluizio Barros Macedo Street, BR 290, São Gabriel, 97300-930, Rio Grande do Sul, Brazil

² Campus São Gabriel, Federal University of Pampa, Aluizio Barros Macedo Street, BR 290, São Gabriel, 97300-930, Rio Grande do Sul, Brazil

³ Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica, Federal University of Pampa, Aluizio Barros Macedo Street, BR 290, São Gabriel, 97300-930, Rio Grande do Sul, Brazil.

ORCID:

Flavia Santos Vieira Novaes: <https://orcid.org/0009-0001-0411-9725>

Angelo Alberto Schneider: <https://orcid.org/0000-0001-8786-006X>

Geferson Fernando Metz: <https://orcid.org/0000-0002-1109-8600>

Rafael Plá Matielo Lemos: <https://orcid.org/0000-0001-6645-9541>

Filipe de Carvalho Victoria: <https://orcid.org/0000-0002-8580-1813>

Andrés Delgado Cañedo: <https://orcid.org/0000-0002-8377-6204>

Funding information:

This work was partially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Proc. 401398/2022-6) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Author contributions:

Flávia Santos Vieira Novaes: experimental procedures, palynological analyses, taxonomic identification of collected plant specimens, theoretical framework, and manuscript writing.

Angelo Alberto Schneider: conducted taxonomic identification of collected plant specimens, and revised the manuscript.

Geferson Fernando Metz: conducted metabarcoding analyses, interpreted data, and

contributed to manuscript revision.

Rafael Plá Matielo Lemos: conducted metabarcoding analyses, interpreted data, and contributed to manuscript revision.

Filipe de Carvalho Victoria: contributed to the theoretical framework, conducted metabarcoding analyses and data interpretation, and contributed to manuscript writing

Andrés Delgado Cañedo: contributed to experimental procedures, theoretical framework, and manuscript writing.

ABSTRACT

Aims: This study investigates, through the identification of bee pollen, which species native of the Brazilian Pampa Biome have the potential to form beekeeping areas, how flowering patterns are distributed throughout the year and assess the maturity level of the metabarcoding technique for evaluating the Pampa's beekeeping products.

Location: Pampa Biome, Brazil

Methods: Corbicular pollen was collected biweekly from four hives over the course of a year, as well as from fertile plants around the apiary. The pollen from the flowers collected was used to create a reference palynological laminarium. The corbicular pollen was identified through palynological analysis of acetolyzed slides and molecular analysis using the DNA-metabarcoding technique. In addition, the abundance and richness of species over the months was as well analysed.

Results: We detected 58 plants foraged by *Apis mellifera*, 46 identified at the species level, being 33 native species. The abundance and richness data showed significant variations throughout the year, with the highest values concentrated in the months of August to December, followed by a peak in March. The most common pollen types were *Eugenia uniflora*, *Eucalyptus* sp., *Senecio brasiliensis* and *Solidago chilensis*. In the metabarcoding analysis, a greater overlap with palynology data was observed when using a reference library derived from palynological results.

Conclusions: The results indicate that palynological analysis is still the most reliable method for detecting the botanical origin of bee products from regions where the genetic diversity of the vegetation is not fully represented in databases. The diversity of native plants from the Brazilian Pampa Biome used by *Apis mellifera* shows their potential to supply bee forage. These data contribute both to the palynology of bee species and to complementing environmental conservation studies, as well as helping to develop sustainable beekeeping management strategies in the region.

Introduction

In Brazil, apiculture has steadily expanded, with Rio Grande do Sul State being a pioneering state and the national leader in honey production for more than a decade, primarily undertaken as a complementary activity to family farming. This activity is recognized as a highly pertinent practice due to its ecological, economic, and social development potential. It facilitates income generation while simultaneously contributing to the conservation of biodiversity in production areas (Silva & Barbalho, 2024).

In addition to the production of honey and various nutraceutical products of human interest, bees play a fundamental role in maintaining and promoting biodiversity through their pollination activities (Papa et al., 2022). Both agricultural and natural ecosystems are reliant on this essential ecosystem service, which is predominantly provided by bees (Barbosa et al., 2017). It is estimated that out of the USD 77.82 billion generated by major agricultural crops in Latin American countries from 2013 to 2018, approximately USD 22.95 billion can be directly attributed to the pollination services rendered by bees (Basualdo et al., 2022).

Given the importance of these pollinators, the annual losses of colonies recorded on a global scale have emerged as a pressing concern (Hristov et al., 2020). In Brazil, data suggests that the annual loss of colonies exceeds 30% (Requier et al., 2024). The primary threats confronting pollinators, both wild and managed, include habitat destruction, as well as the use of pesticides—two of the most urgent challenges and significant contributors to biodiversity loss (Oddie & Dahle, 2024). These threats are closely tied to environmental changes, particularly in regions where habitat degradation is intensifying, such as in Brazil's biomes.

From Brazilian biomes, the Pampa notably exhibiting the lowest proportion of protected areas designated as conservation units. Furthermore, the biome has experienced the most significant proportional loss of native vegetation over the past 36 years, highlighting a suppression of approximately 3.4 million hectares between 1985 and 2021, as reviewed by Michel and Overbeck, 2024.

In this context, the investment in the restoration of plant diversity focused on native species is an essential strategy for planning sustainable beekeeping production areas, supporting both managed and wild pollinators (Kassa Degu & Regasa Megerssa, 2020). In general, a diverse supply of flowers provides a more

balanced nutrition, increases the volume of available food, strengthens resistance to diseases, and extends the floral calendar, thus making artificial feeding and migratory beekeeping unnecessary (Oddie; Dahle, 2024).

The identification of bee pollen is one way to determine which species of the local floral composition are foraged by bees and how their distribution occurs throughout the seasons (Borges, Silva, and Nascimento, 2022). Although palynology is an important tool for determining the botanical origin of beekeeping products, some factors limit its use, such as the need for specialized knowledge, and the time required for analysis. These challenges have driven the search for new investigative methods, such as molecular analysis through the DNA metabarcoding technique (Richardson et al., 2015). It is a faster method that does not require specialized knowledge in pollen grain taxonomy; however, it also has limitations, such as the need for reference libraries containing data on species present in the original flora of the evaluated product (Richardson et al., 2015).

Despite the historical importance of beekeeping in the Brazilian Pampa biome, particularly in relation to honey production, scientific research focused on the apicultural flora of this region remains limited. This study aims to compile a comprehensive inventory of plant species with apicultural relevance within the Brazilian Pampa biome by identifying bee-collected pollen. Additionally, it seeks to analyze the temporal distribution of these species throughout the year and to evaluate the adequacy of existing databases in determining native species of the biome, by comparing metabarcoding results with those obtained through classical palynological methods. The results aim to enhance the socio-environmental development of the region and to provide strategic tools for the planning of agroecological production areas.

Materials and Methods

Study Area

The research was undertaken over a one-year period, spanning from November 2023 to October 2024, at the experimental apiary of the Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), located in the São Gabriel campus in the

southwestern region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil, with geographic coordinates of 30°20'09"S and 54°19'12"W. This region is situated within the Pampa Biome and is characterized by a humid subtropical climate, as evidenced by an average maximum temperature exceeding 22°C and minimum temperatures ranging from –3°C to 18°C, pursuant to the Köppen classification as modified by Álvares et al. (2014). The area identified as having foraging potential for the bees at the experimental apiary encompasses both managed spaces and regions consisting of native vegetation.

Collection of Corbicular Pollen

Biweekly collections of bee pollen were conducted, with the exception of April and May, during which only a single monthly collection occurred due to substantial rainfall in the region. Pollen traps were strategically positioned at the entrances of four Langstroth hive models, thereby facilitating the collection and storage of corbicular pollen (pollen baskets) over a one-hour period (08:00–09:00). Throughout the duration of the study, the hives were not actively managed; only honey supers were introduced to afford the bees additional space for honey storage. The collected material was sorted while fresh by pollen type. To count the pollen, the pellets were first separated based on color, size and texture. Each group was then analyzed under a microscope with the material still fresh, in order to confirm the distinction between pollen types. After this verification, the identified types were quantified, considering single pollen pellet as a unit.

The pollen has been apportioned for two distinct analytical procedures: palynological analysis utilizing slides with acetolyzed material and molecular analysis through DNA metabarcoding, as delineated below.

Bee floral resource survey

To assist in identifying the corbicular pollen, a survey of fertile plant species surrounding the apiary was conducted throughout the study year. The adopted methodology followed the walking survey approach (Filgueiras et al., 1994), which involved weekly observations and annotations of plant species visited by *Apis mellifera* within the apiary region. Photographic records and collections of fertile plant branches were also made during these walks.

Following collection, plant species were identified using taxonomic keys from specialized literature, as well as data and images from virtual collections. Anthers from the flowers were removed and stored in tubes for the preparation of a reference palynological slide library. Herbarium specimens were prepared according to standard methodology and deposited in the institutional herbarium (HBEI) for conservation and reference purposes (The registration numbers are available in the Supplementary Material (Supplementary Table 1).

Pollen Sample Preparation

Pollen sample preparation for slide mounting followed the acetolysis method proposed by Erdtman (1960). After 24 hours in tubes containing 1 mL of pure glacial acetic acid, the suspension was centrifuged for 5 minutes at 380 xG, the acid was removed, and the pollen grains were subjected to 5 mL of an acetolysis mixture (acetic anhydride and sulfuric acid 9:1), incubated in a water bath at 100°C, stirring with a glass rod for three minutes. The material was then centrifuged for 3 minutes at 850 xG and subsequently washed with 10 mL of distilled water. After washing, the material was resuspended in 2 mL of glycerinated water (1:1) and left for at least 30 minutes to allow pollen grain hydration. Finally, three permanent slides were prepared for each pollen type.

Taxonomic analysis of the pollen was performed by comparison with the reference slide library assembled from collected plant specimens, as well as with the aid of specialized literature (Punt et al., 2007; Barth & Melhem, 1988; Salgado-Labouriau, 1973). Illustrations were made using acetolyzed pollen grains under an Axio Scope A2 optical microscope equipped with an AxioCam MRc (Zeiss, Germany).

High-Throughput PCR Survey

The extraction of DNA was performed utilizing the PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific), with the samples consisting of a composite of one pollen pellet from each type of pollen. The extracted DNA was quantitatively assessed and evaluated using the NanoVue spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences). A total of 100 ng of DNA was utilized as a template for amplifying the ITS2 region, employing the primers ITS-u3 (CAWCGATGAAGAACGYAGC) and ITS-p4 (CCGCTTAKTGATATGCTTAAA), in accordance with the protocol delineated by

Cheng et al. (2016).

Amplicon sequencing was conducted on the GridION platform (Oxford Nanopore Technologies, UK) at the Bioinformatics Laboratory of the Antarctic Vegetation Studies Center, situated at the São Gabriel campus of the Universidade Federal do Pampa. The amplicon library was constructed from genomic DNA employing the Ligation Kit (SQK-LSK110), meticulously conforming to the manufacturer's directives. This process encompassed end-preparation, adapter ligation, and clean-up procedures prior to being loaded onto an R9.4.1 Flow Cell for sequencing

Metabarcoding Analyses

The reads generated from the previous step were basecalled using the Dorado version 0.7.1 (<https://github.com/nanoporetech/dorado>). The raw sequences underwent processing through Porechop to eliminate artefacts and ONT adapters, subsequently followed by alignment utilising BLASTN against the PLANITS database (Banchi et al., 2020), which consists of curated ITS2 sequences for the identification of plant species. The taxonomy assessment identification process was substantiated by species ITS access, manually obtained from GenBank, using insights derived from palynological morphology as outlined in this study. The resultant read-mapped XML file was visualized employing Kraken software to verify the acquired OTU (Operational Taxonomic Units) universe (Lu et al., 2022). The Kraken2 pipeline was specifically configured to incorporate a customized database containing sequences from both GenBank and PLANITS, thereby achieving a more precise and context-specific classification pertinent to this investigation. The application of Kraken2 enabled a comprehensive assessment of putative species, yielding detailed and reliable taxonomic classifications validated through supplementary analyses. This methodology was essential in ensuring the precision of taxonomic identifications and supporting the conclusions drawn from this research.

Taxonomical assignment

Furthermore, the taxonomic assigning was enhanced through MEGAN6 software, facilitating the integration of OTU identifications via palynological morphology identification. The OTU visualization was conducted utilizing MEGAN

Community Edition (CE) (Huson et al., 2016), facilitating the interactive exploration and examination of extensive microbiome sequencing data. Taxonomic and functional analyses of the reads were executed using the LCA (Lowest Common Ancestor) algorithm, which assigns reads to nodes in the NCBI taxonomy based on their alignments with a designated reference database

Results and Discussion

Morphological analysis results

Through morphological analysis of the pollen grains collected by *Apis mellifera* throughout the study year, 51 pollen types were identified, belonging to 27 botanical families and 34 genera; in addition, one pollen type could not be identified, even at the family level. Among the observed families, Asteraceae stood out with 12 species, followed by Myrtaceae with four species, and Euphorbiaceae, Fabaceae, and Rubiaceae with three species each. The remaining families were represented by only one or two species (Table 1). These findings support the generalist foraging behavior of *A. mellifera* in the search for floral resources, as reviewed by (Silva & Barbalho, 2024). On the other hand, the data also highlight the floral richness that the Pampa biome provides to the region's beekeeping activity.

Table 1 – Pollen types found in bee pollen collected in the Brazilian Pampa Biome between November 2023 and October 2024, along with their respective life forms and origins.

Family/Species	Life form	Origin
Amaranthaceae		
<i>Alternanthera philoxeroides</i> (Mart.) Griseb.	Herb	native
<i>Amaranthus hybridus</i> L.	Herb	exotic
Anacardiaceae		
<i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi	Tree	native
Apiaceae		
<i>Eryngium horridum</i> Malme	Herb	native
Arecaceae		
<i>Butia odorata</i> (Barb.Rodr.) Noblick	Palm tree	native

Asparagaceae

Agave sp. L. Arborescent

Asteraceae

Indeterminate type

Indeterminate type

Aspilia montevidensis (Spreng.) Kuntze Herb native

Austroeupatorium inulaefolium (Kunth) R.M.King & H.Rob. Subshrub native

Chromolaena hirsuta (Hook. & Arn.) R.M.King & H.Rob. Subshrub native

Mikania cordifolia (L.f.) Willd. Vine native

Mikania micrantha Kunth Vine native

Pluchea sagittalis (Lam.) Cabrera Subshrub native

Pterocaulon polystachyum DC. Subshrub native

Senecio brasiliensis (Spreng.) Less. Herb native

Solidago chilensis Meyen Herb native

Taraxacum officinale F.H. Wigg. Herb naturalized

Begoniaceae

Begonia cucullata Willd. Herb native

Boraginaceae

Echium plantagineum L. Herb exotic

Brassicaceae

Brassica juncea (L.) Czern. Herb exotic

Raphanus sativus L. Herb exotic

Calyceraceae

Acicarpha tribuloides Juss. Herb native

Caprifoliaceae

Lonicera japonica Thumb. Vine exotic

Commelinaceae

Commelina erecta L. Herb native

Convolvulaceae

Ipomoea purpurea (L.) Roth Vine native

Euphorbiaceae

Acalypha gracilis Spreng. Subshrub native

Ricinus communis L. Shrub exotic

<i>Sapium haemospermum</i> Müll.Arg.	Tree	native
Fabaceae		
<i>Erythrina crista-galli</i> L.	Tree	native
<i>Trifolium repens</i> L.	Herb	exotic
<i>Vachellia caven</i> (Molina) Seigler & Ebinger	Shrub	native
Iridaceae		
<i>Babiana angustifolia</i> Sweet	Herb	exotic
Lamiaceae		
<i>Plectranthus</i> sp. L'Hér.		
Loranthaceae		
<i>Tripodanthus acutifolius</i> (Ruiz & Pav.) Tiegh.	Herb	native
Lythraceae		
<i>Cuphea glutinosa</i> Cham. & Schltl.	Subshrub	native
<i>Heimia salicifolia</i> Link	Subshrub	native
Moraceae		
<i>Morus nigra</i> L.	Shrub	exotic
Myrtaceae		
Indeterminate type		
<i>Eucalyptus</i> sp. L'Hér. (1)	Tree	exotic
<i>Eucalyptus</i> sp. L'Hér. (2)	Tree	exotic
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Tree	native
Onagraceae		
<i>Ludwigia peruviana</i> (L.) H.Hara	Subshrub	native
Oxalidaceae		
<i>Oxalis brasiliensis</i> G.Lodd.	Herb	native
<i>Oxalis sellowiana</i> Zucc.	Herb	native
Pinaceae		
<i>Pinus</i> sp. L	Tree	exotic
Poaceae		
<i>Paspalum notatum</i> Flüggé	Herb	native
Rubiaceae		
<i>Borreria</i> sp. G.Mey.		
<i>Borreria verticillata</i> (L.) G.Mey.	Herb	native
<i>Guettarda uruguensis</i> Cham. & Schltl.	Tree	native
Solanaceae		

Solanum sp. L.

Indeterminate type (1)

The Asteraceae family is present across various vegetation formations, particularly notable within grassland physiognomies, thus establishing it as one of the most representative families of the Pampa Biome (Liesenfeld et al., 2019). The significance of this family in the exploration of apicultural flora in southern Brazil has been previously emphasized (Radaeski et al., 2019), underlining its essential contribution to bee foraging habitats by supplying pollen and nectar, and by aiding in the planning and restoration of native vegetation areas associated with beekeeping.

Regarding the origin of the identified pollen types, a predominance of native species (70.45%) was observed, confirming the significant potential of local vegetation to meet the needs of apicultural pastures. These findings reinforce not only the possibility but, more importantly, the necessity for beekeeping to develop in a strategic and sustainable manner within the current environmental scenario. As noted by Ferreira et al. (2021), it is possible to intertwine income generation with the conservation and even restoration of degraded areas through the reestablishment of native vegetation, facilitated by the pollination of economically important bees. By embracing such values, not only can environmentally responsible production be ensured, but the final product can also be characterized and enhanced in value, as it will possess unique attributes derived from the local flora. This aligns with the increasing consumer demand for traceable food products, given the growing interest in food origins and the environmental impacts associated with their production (Klosowski, Kuasoski and Bonetti, 2020).

Among the exotic pollen types identified, *Eucalyptus* sp. and *Pinus* sp. pollen stand out as species widely used in the Pampa for forestry. Alongside other extensive monoculture areas in the state, these plantations are now regarded as one of the major threats to the biome, resulting in the suppression of native vegetation, loss of biodiversity, and severe impacts on soil and water resources (Baietto et al., 2024). There is a strong relationship between beekeeping and *Eucalyptus* sp. forestry in Rio Grande do Sul, due to the stability and density of its flowering, which helps to compensate for periods of floral resource scarcity for many beekeepers, including through migratory beekeeping (Wolff, Schnell & Schuhli, 2021).

The additional exotic species identified include *Amaranthus hybridus* L., commonly referred to as “caruru,” which is characterized as an invasive weed typically linked to economic losses in monoculture farming (Witter et al., 2023). Furthermore, *Echium plantagineum* L. is utilized in ornamental gardens and is regarded as a species with a high dispersal potential and challenging control measures (Minuzzi, 2022). The species *Brassica juncea* and *Morus nigra* are cultivated for food purposes, while *Raphanus sativus* L. and *Trifolium repens* L. are cultivated as forage species, with the latter having naturalized in the environment. *Ricinus communis* L. is grown for both food and pharmaceutical purposes (Franke, Scholl & Aigner, 2019). *Babiana angustifolia* Sweet and *Lonicera japonica* Thumb have been introduced as ornamental species, with the latter classified as an invasive exotic plant that adversely affects native flora (Stumpf, 2009).

Concerning the vegetational strata foraged by *Apis mellifera* for pollen collection, the herbaceous stratum is predominant (44.44%), followed by the shrub (24.44%) and tree strata (22.22%). Climbing plants comprise a minor proportion at 8.89%. These findings not only represent the composition of the Pampa Biome, which is primarily characterized by grasslands abundant in herbaceous vegetation (Marchi et al., 2018), but also underscore the significance of this plant group from an apicultural perspective, as previously documented in floristic surveys conducted across various regions of Brazil (Vasconcelos et al., 2021).

Bees of the *Apis* genus exhibit a preference for foraging in more open areas, which explains the predominance of herbaceous species in multiple apicultural flora surveys. This tendency is considerably advantageous for honey production, as evidence indicates that these plants typically yield a higher nectar flow with a greater sugar concentration in comparison to tree species. Furthermore, they contribute to the production of honey with attributes that are more appealing to consumers, including a lighter coloration (Wolff 2018a).

The presence of native herbaceous plants in beekeeping areas of the Pampa represents an effective strategy for the development of sustainable apicultural practices. Not only do these plants offer a rich and diverse diet for bee colonies, but they also play a crucial role in maintaining ecological balance and preserving local biodiversity. The ecological role of this plant stratum is fundamental, contributing to soil moisture retention, erosion prevention, and resilience in highly disturbed

environments. These attributes make herbaceous vegetation a key ally in the early stages of succession and the regeneration of degraded areas (Maraschin-Silva, Scherer & Baptista, 2009). Unfortunately, the suppression of native grassland vegetation is one of the major environmental challenges faced by Brazil, particularly in the Pampa biome, which has suffered the highest proportional loss of natural non-forest areas in the past 38 years, amounting to 2.85 million hectares of devastated land (Michel & Overbeck, 2024).

Regarding the collected material, with the exception of *Babiana angustifolia*, all identified pollen types belong to genera previously documented in the literature as being visited by *A. mellifera* for pollen and/or nectar collection in various regions of Brazil. This reinforces the importance of these plants as essential food sources for these bees (Brugnerotto et al., 2021; Câmara et al., 2021).

The abundance and richness of apicultural pollen showed significant variations throughout the study year. The highest values for both variables were concentrated between late winter and early summer (August to December), indicating greater species diversity supplying pollen during these months. A sharp decline in abundance was observed in January and February, followed by a peak in March. The lowest values for both variables were recorded in mid-autumn and early winter (April to July). It is worth noting that collections in April and May were conducted only once per month, which, regardless of other factors, was already expected to yield lower results for these months (Figures 1 and 2).

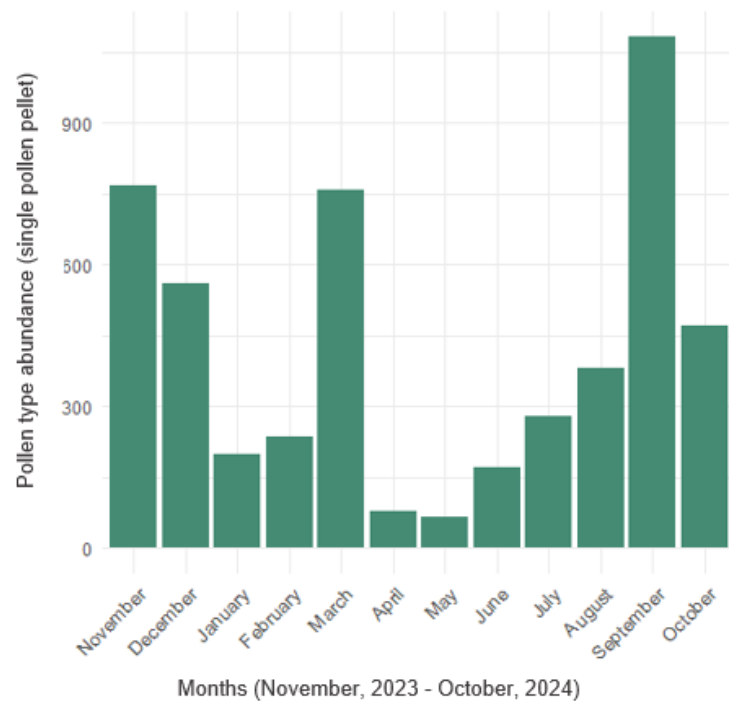


Figure 1 - General abundance of the identified pollen types over the 12 months of sampling.

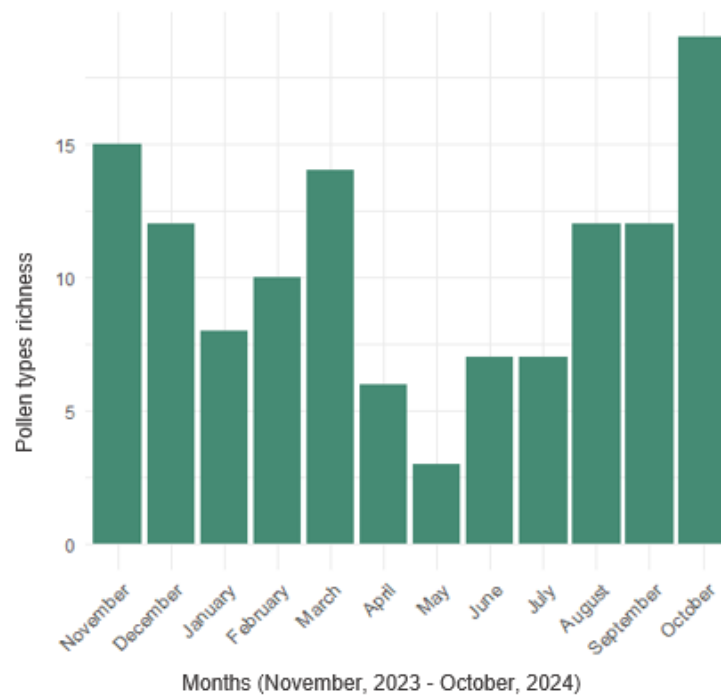


Figure 2 - Richness of identified pollen types over the 12 months of sampling.

Among the factors influencing the obtained results, seasonal variations and the time of collection stand out, as they not only affect the availability of floral resources but also alter the foraging activity dynamics of the bees (Silveira et al. 2015). Although the species *A. mellifera* has effective thermoregulation mechanisms, extreme temperature conditions inevitably compromise their behaviors (Mota et al. 2023). In the case of October, the highest pollen richness was observed, but the abundance was relatively low. In this month, a large number of bees were seen passing through the holes with pollen loads, possibly carrying smaller corbicular pollen pellets due to undetermined environmental factors that hindered the proper functioning of the collection system.

The pollen types with the highest abundance throughout the study year were: *Eugenia uniflora*, the most abundant in two months, July and September; *Eucalyptus sp.*, which stood out as the most abundant type in spring, in November, and then in winter, in August; *Senecio brasiliensis* in December; *Solidago chilensis* in March, a month with a peak in richness and abundance after two months of low results. The other types were more homogeneous in terms of abundance. Regarding occurrence, *Eucalyptus sp.* was the most present type throughout the months, absent only in December and January, in contrast to 18 other types, which appeared only once, with *Ludwigia peruviana* being the least frequent and abundant type (Figure 3).



Figure 3 - Distribution chart of pollen types over the months, with variation in color and size according to abundance. (The unit of count corresponds to a single pollen pellet)

It is noted that, even though the occurrence of *Eucalyptus* spans from February to November (10 months per year), its sampling in March and September was minimal compared to the abundance of pollen from *Solidago chilensis* and *Eugenia*

uniflora. This fact may be influenced by multiple factors, such as: the bees' preference for floral resources offered by these species; greater abundance of these flowers in the foraging area; the presence of these plants in areas closer to the apiary; or even the reduced flowering of Eucalyptus compared to other periods of the same year.

The apicultural role of *Solidago chilensis* has already been highlighted by Matiello, Granzotto, and Rovedder (2022), but its importance extends beyond apiculture, as it provides resources for a diverse entomofauna, making it a strong ally in the recovery stages of degraded areas, given its easy propagation and ability to establish in such environments. *Eugenia uniflora*, on the other hand, is a tree species with abundant flowering, offering pollen as the sole floral reward to its visitors (Silva and Pinheiro, 2007). These species are fundamental in the composition of the apicultural forage, as they tend to have a longer-lasting bloom, often filling food scarcity periods, and, although it is visited by a variety of insects, its pollination is carried out by bees, especially *A. mellifera* (Wolff, 2018b).

The type *Senecio brasiliensis* has been recorded as predominant in pollen analyses of honey from southern Brazil (Barth, 2004). In this study, *S. brasiliensis* was identified as the most abundant pollen in the December collection. Commonly known as "Maria-mole," plants of this genus are strongly associated with the poisoning and death of cattle due to ingestion, especially of *S. brasiliensis*, because of the presence of toxic pyrrolizidine alkaloids (PAs) (Sandini et al. 2013). It is a species with massive and attractive flowering for *A. mellifera*, although toxic alkaloids have been detected in honey produced from these flowers. Although found in insufficient levels to cause intoxication, the presence of PAs in honey is one of the means of ingestion of these alkaloids by humans, which makes *S. brasiliensis* a species that should preferably not be kept near apiaries (Valese et al., 2021).

During walking survey to observe the behavior of *A. mellifera* and collect fertile plants around the apiary, some plant species were observed being foraged for pollen, but the corresponding pollen types were not found in the samples collected from the hive-installed collectors. These species include: *Sonchus oleraceus* L. (exotic, established in RS), *Eryngium nudicaule* Lam. (native), *Centaurium erythraea* Rafn. (naturalized), *Blumenbachia* sp. Schrad., *Cunila microcephala* Benth. (native), *Lantana camara* L. (exotic), and *Phyla nodiflora* (L.) Greene (exotic). Therefore, this study reports the occurrence of 58 species in the study area that are foraged by *A.*

mellifera, with 52 identified pollen types through corbicular pollen (Figures 4 to 8), and 6 species observed in the field.

The time of pollen collection influences which species will be found, as both the attractiveness and abundance of floral resources may vary throughout the day in some cases (Vidal, Santana, and Vidal, 2008). Due to the restricted collection period, it is possible that other species from the native vegetation of the region, which potentially contribute floral resources to the bees, may be absent from the results presented. Thus, plants that offer resources or are more attractive to bees at different times, or those that were fertile on days when no collection occurred, were not recorded, indicating that an even greater variety of species contributes to maintaining the apicultural forage in the Brazilian Pampa biome. These data highlights the need to expand such research to gain a comprehensive understanding of the full spectrum of plant species that constitute the beekeeping flora of this biome.

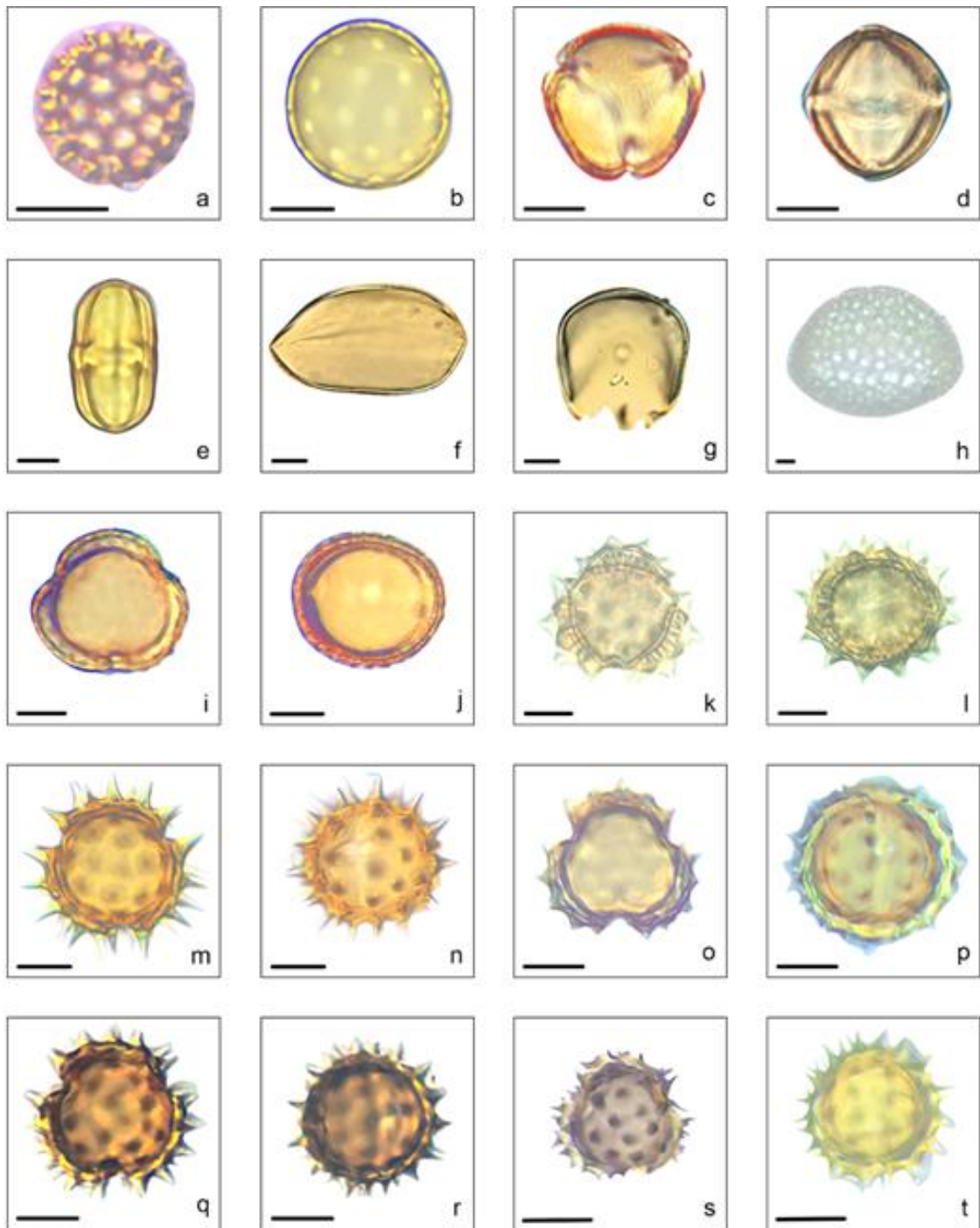


Figure 4 - Photomicrographs of the pollen types found in the apicultural pollen collected in the Brazilian Pampa Biome: a-b. Amaranthaceae, Polar view: a. *Alternanthera philoxeroides*, b. *Amaranthus* sp.; c-d. Anacardiaceae: *Schinus terebinthifolia*, c. Polar view, d. Equatorial view; e. Apiaceae: *Eryngium horridum*, equatorial view; f-g. Arecaceae: *Butia odorata*, f. Polar view, g. Equatorial view; h. Asparagaceae: *Agave* sp.; i-t. Asteraceae: i-j. *Asteraceae* sp.1, i. Polar view, j. Equatorial view; k-l. *Asteraceae* sp.2, k. Polar view, l. Equatorial view; m-n. *Aspilia montevidensis*, m. Polar view, n. Equatorial view; o-p. *Austroeupatorium inulaefolium*, o. Polar view, p. Equatorial view; q-r. *Chromolaena hirsuta*, q. Polar view, r. Equatorial view; s-t. *Mikania cordifolia*, s. Polar view, t. Equatorial view. Scale = 10 μ m.

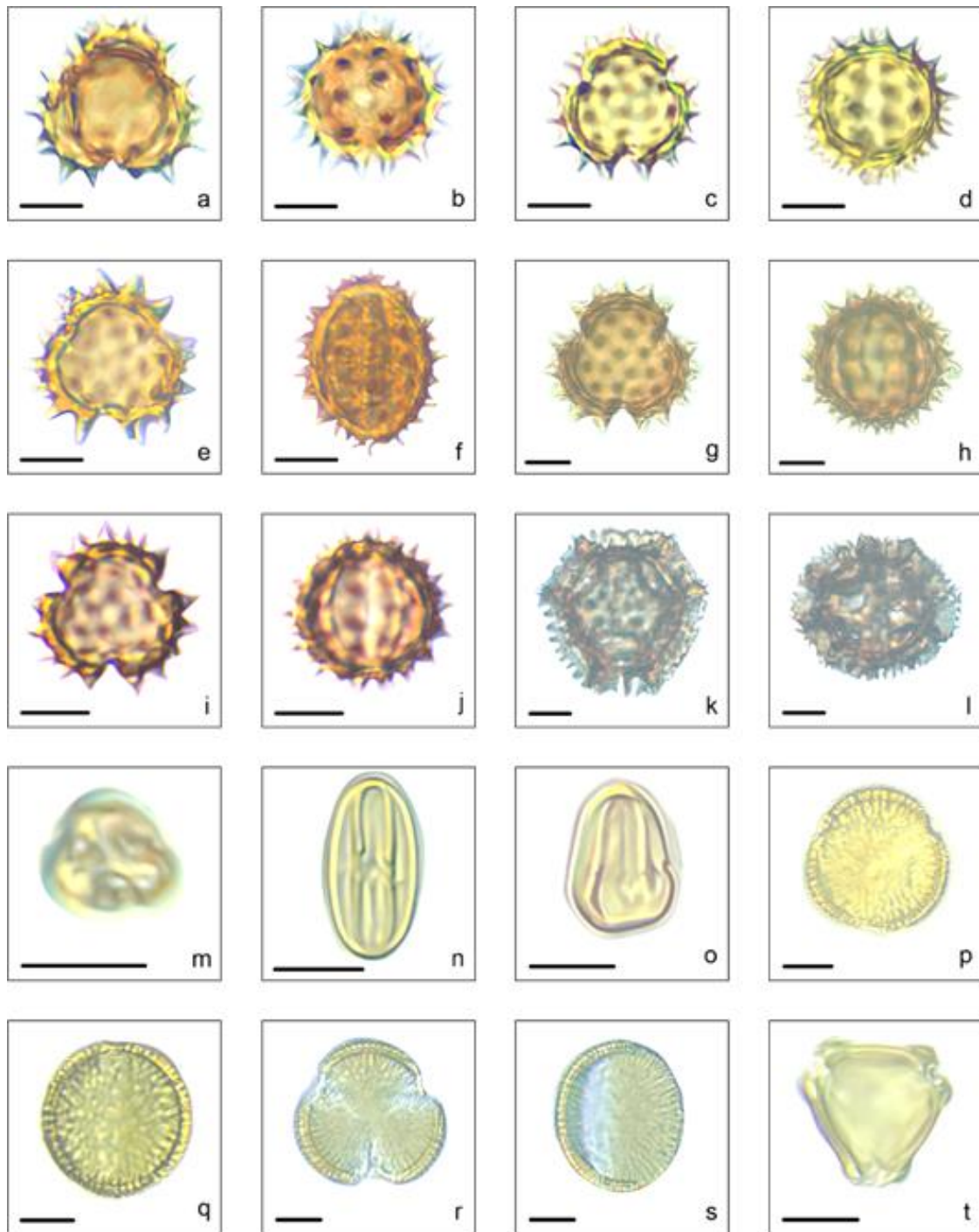


Figure 5 - Photomicrographs of the pollen types found in the apicultural pollen collected in the Brazilian Pampa Biome: a-l. Asteraceae: a-b. *Mikania micrantha*, a. Polar view, b. Equatorial view; c-d. *Pluchea sagittalis*, c. Polar view, d. Equatorial view; e-f. *Pterocaulon polystachyum*, e. Polar view, f. Equatorial view; g-h. *Senecio brasiliensis*, g. Polar view, h. Equatorial view; i-j. *Solidago chilensis*, i. Polar view, j. Equatorial view; k-l. *Taraxacum officinale*, k. Polar view, l. Equatorial view; m-n. Begoniaceae: *Begonia cucullata*, m. Polar view, n. Equatorial view; o. Boraginaceae: *Echium plantagineum*, equatorial view; p-s. Brassicaceae, p-q. *Brassica juncea*, p. Polar view, q. Equatorial view; r-s. *Raphanus sativus*, r. Polar view, s. Equatorial view; t. Calyceraceae: *Acicarpha tribuloides*, Polar view. Scale = 10 μ m.

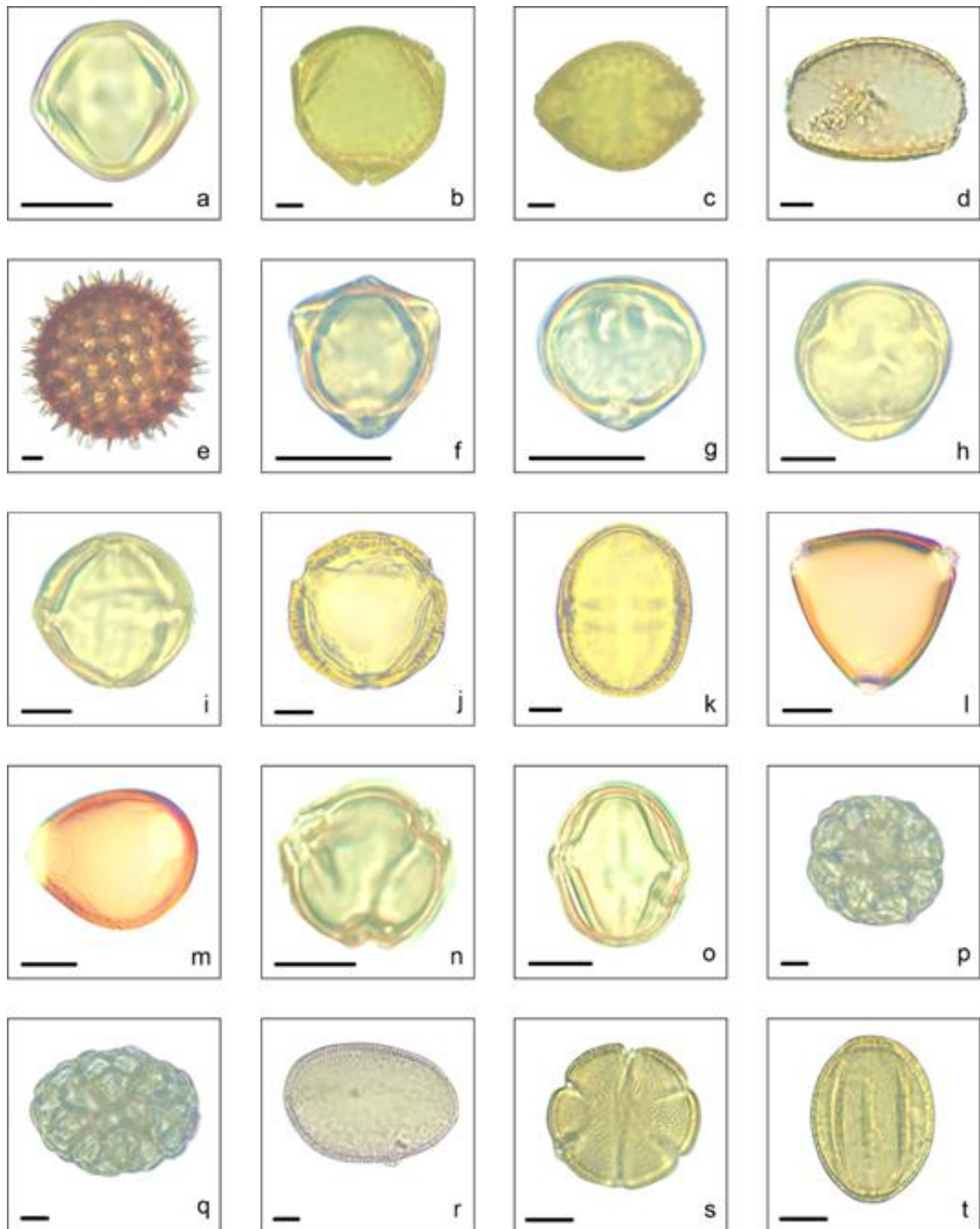


Figure 6 - Photomicrographs of the pollen types found in the apicultural pollen collected in the Brazilian Pampa Biome region: a. Calyceraceae: *Acicarpha tribuloides*, equatorial view; b-c. Caprifoliaceae: *Lonicera japonica*, b. Polar view, c. Equatorial view; d. Commelinaceae: *Commelina erecta*, polar view; e. Convolvulaceae: *Ipomoea purpurea*, polar view; f-k. Euphorbiaceae: f-g. *Acalypha gracilis*, f. Polar view, g. Equatorial view; h-i. *Ricinus communis*, h. Polar view, i. Equatorial view; j-k. *Sapium haemospermum*, j. Polar view, k. Equatorial view; l-q. Fabaceae: l-m. *Erythrina crista-galli*, l. Polar view, m. Equatorial view; n-o. *Trifolium repens*, n. Polar view, o. Equatorial view; p-q. *Vachellia caven*, p. Polar view, q. Equatorial view; r. Iridaceae: *Babiana angustifolia*; s-t. Lamiaceae: *Plectranthus sp.*,

s. Polar view, t. Equatorial view. Scale = 10 µm.

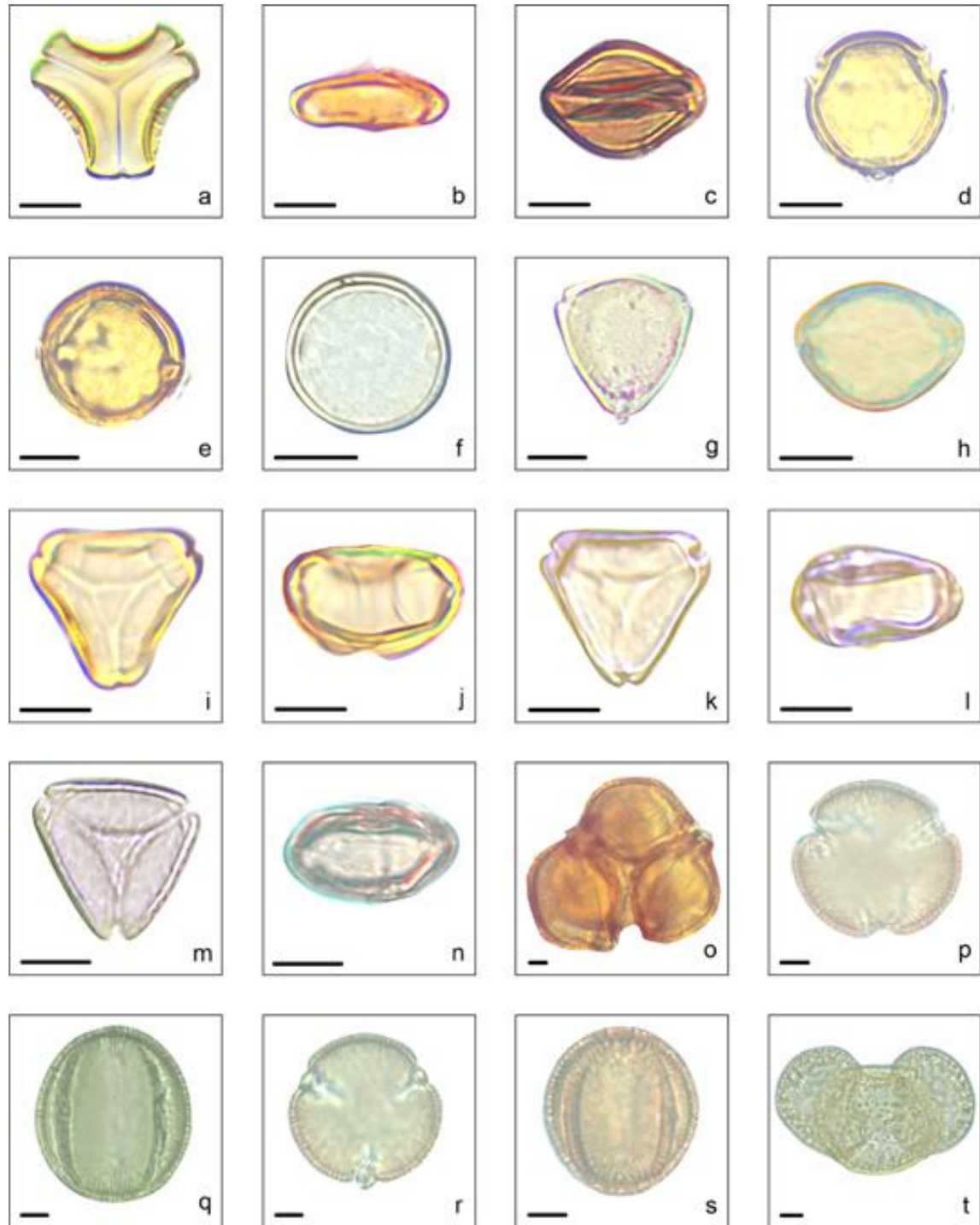


Figure 7 - Photomicrographs of the pollen types found in the apicultural pollen collected in the Brazilian Pampa Biome region: a-b. Loranthaceae: *Tripodanthus acutifolius*, a. Polar view, b. Equatorial view; c-e. Lythraceae: c. *Cuphea glutinosa*; d-e. *Heimia salicifolia*, d. Polar view, e. Equatorial view; f. Moraceae: *Morus nigra*; g-n. Myrtaceae: g-h. *Myrtaceae sp.1*, g. Polar view, h. Equatorial view; i-j. *Eucalyptus sp.1*, i. Polar view, j. Equatorial view; k-l. *Eucalyptus sp.2*, k. Polar view, l. Equatorial view; m-n. *Eugenia uniflora*, m. Polar view, n. Equatorial view; o. Onagraceae: *Ludwigia peruviana*; p-s.

Oxalidaceae: p-q. *Oxalis sp.*, p. Polar view, q. Equatorial view; r-s. *Oxalis sellowiana*, r. Polar view, s. Equatorial view; t. Pinaceae: *Pinus sp.*, polar view. Scale = 10 μm .

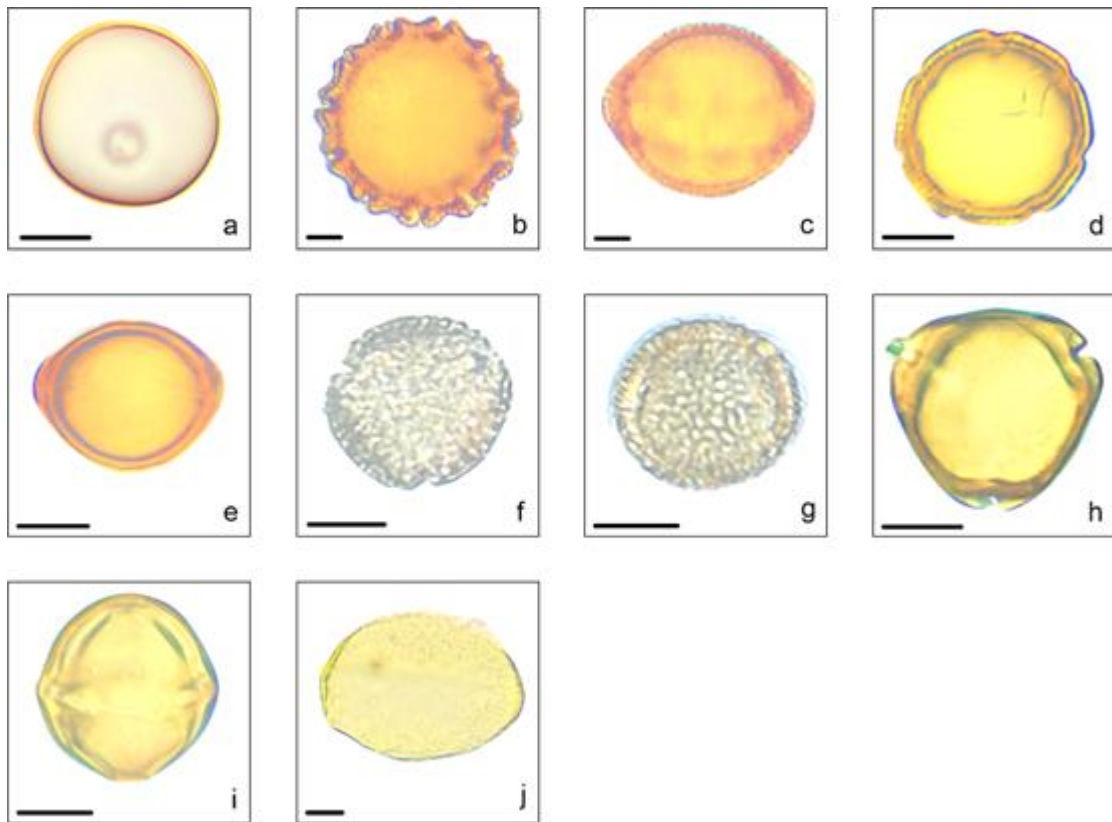


Figure 8 - Photomicrographs of the pollen types found in the apicultural pollen collected in the Brazilian Pampa Biome: a. Poaceae: *Paspalum notatum*, b-g. Rubiaceae: b-c. *Borreria sp.*, b. Polar view, c. Equatorial view; d-e. *Borreria verticillata*, d. Polar view, e. Equatorial view; f-g. *Guettarda uruguensis*, f. Polar view, g. Equatorial view; h-i. *Solanaceae: Solanum sp.*, h. Polar view, i. Equatorial view; j. Indeterminate type. Scale = 10 μm .

Pollen metabarcoding analysis

The use of metabarcoding to identify the botanical origin of honey and corbicular pollen garners significant interest, both from the perspective of beekeeping management and for understanding the flora of a given region (Hawkins et al., 2015). Compared to the classical method of palynological evaluation by microscopy, this approach necessitates less time and does not require expertise in the local flora (Chiara et al., 2021). However, published data indicate that methodologies, from DNA extraction to OTU generation, do not exhibit 100% congruence with microscopic observations and still require optimization, both in processes leading to amplicon

production and in constructing databases that encompass the local flora.

To assess the feasibility of employing metabarcoding to study the apicultural flora of the Brazilian Pampa Biome, the set of collected pollens was evaluated using the metabarcoding technique. Following the sequencing of DNA extracted from a mixture of 52 corbiculae loads, the data were analyzed in two distinct ways. In the first analysis, the standard method was employed, where the analyzer was unaware of the species present in the mixture (Supplementary Figure 1). This analysis produced an output comprising 41 taxa, distributed across 23 families, with 22 identified at the species level, 16 at the genus level, and three at the tribe level (Supplementary Figure 2). When comparing these results with those obtained through microscopic identification of the pollen loads, an overlap of 69% was observed for the families, 54% for genera, and only 27% for species. Additionally, 7 false positives and 12 false negatives were identified at the family level, corresponding to 13 genera and 11 species identified through palynology.

The second analysis was performed following a manual adjustment of the database, considering the results from the palynology. This approach resulted in 50 taxa distributed across 19 families, with 29 at the genus level and 41 at the species level. The adjustment resulted in a higher number of species per genus. When compared to the palynological data, a overlap of 100% was achieved at the family level, 93% at genus level, but only 29% of the species corresponded to the results of palynology (Figure 9). Despite the higher number of taxa, compared to the first sequencing result, many of the pollen types identified by palynology did not appear in the current results, with 8 families absent, corresponding to 10 genera and 8 species.

Figure 9 – **Taxonomy Assignment of Corbicular Pollen from an Apiary in the Brazilian Pampa Biome Using Metabarcoding Analysis.** This cladogram illustrates the OTU diversity of pollen collected by *Apis mellifera* in the Brazilian Pampa Biome, grouped into major clades (e.g., Asterids, Rosids, Fabids, Malvids, Commelinids, Pentapetales, Mesangiospermae). The level of box filling in blue indicates the relative frequency of each operational taxonomic unit (OTU), with more filled boxes representing higher frequency. The most frequent OTUs, indicated by the most filled boxes, include *Acicarpa tribuloides*, *Solidago chilensis*, *Chromolaena odorata*, *Pterocaulon polystachyum*, and *Taraxacum officinale* (all Asteraceae), reflecting the dominance of this family in the pollen profile and the diverse floral resources available to honeybees in the Pampa Biome.

It is noteworthy that the families identified in the sequencing results correspond to those represented by a greater number of species in the palynological analysis. Consequently, the corbicular pollen mixture contained an elevated quantity of pollen from these families. Conversely, the families that are absent in the sequencing correspond to those associated with only one or two pollen types identified through microscopy. This inconsistency between the morphological analysis data and the metabarcoding data, both at the genus and family levels, has been previously described by Wirta et al. (2021) in their analysis of DNA extracted from pollen found in honey samples. The authors discovered false negatives, similar to those in the present study, although they did not report the occurrence of false positives when examining the ITS2 region of plants. In a separate investigation analyzing Australian honeys, Milla et al. (2021) noted an overlap of 67.7% in the identified taxa at the family level and 44.4% at the genus level. These results bear resemblance to those of the present study when utilizing available databases without considering the palynological context data.

Pollen DNA metabarcoding has revealed a complex network characterised by a variety of species and interactions, indicating a lower degree of specialisation compared to morphology observed surveys (Bänsch et al., 2020). These results pose a challenge to microscopy-based studies of pollen transport that reported similar species counts (Souza et al. 2021). Employing DNA metabarcoding to analyse pollen movement necessitates an understanding of local plant diversity as well as a robust genetic reference database (Arstingstall et al. 2021; Richardson et al. 2021). The ITS2 marker exhibits superior taxonomic resolution compared to other markers typically applied to plant metabarcoding, particularly when multiple sequences per species are involved (Kolter et al. 2021). The ITS2 marker achieves a higher species-

level resolution (approximately 86.1%) even with shorter amplicons (Moorhouse-Gann et al. 2018). However, the use of additional markers, with a preference for ITS2 over *rbcl*, is recommended to attain even higher resolution (Bell et al., 2020). This could potentially change our interpretation in this paper. Previous research indicates that ITS2 reads do not necessarily correlate with the number of pollen grains, as noted by Baksay et al. (2020) and Pornon et al. (2016), as this can be influenced by sample contamination, extraction methods, and inherent biases.

Although the precise quantity of pollen grains analysed for metabarcoding remains unclear, it is anticipated to exceed that utilized for microscopy, where the detection rate of rare taxa is linked with the number of grains analysed (Bertrand et al. 2019). However, assessing rare species may require examining at least 500 grains, as suggested by Lau et al. (2018). In summary, when employing this technique, it is crucial to consider the DNA extraction method and the choice of marker to enrich and enhance the resolution of the results, ensuring accurate taxonomical assignments.

It is essential to emphasise that, although the pollen mixture contained only one load of each pollen type, some taxa were overrepresented in relation to others, such as *Acicarpa tribuloides* and *Brassica* sp. In this context, it is important to highlight that, in addition to potential differences in pollen grain fertility (the presence of DNA within them) or the efficiency of their DNA extraction, one must also consider the number of repetitions of the ITS sequences in the genomes of each species and the specific sequence of each (Alvarez et al., 2003). When evaluating these data collectively, it becomes evident that there is a need to improve the databases used, tailoring them to each research region. Furthermore, it is necessary to assess the behaviour of each pollen type from DNA extraction to sequencing to obtain quantitative data that accurately represent the reality observed in palynological studies analyses.

Our findings derived from the assessment of corbicular pollen, utilizing both palynological methodologies and metabarcoding techniques, illustrate the floral diversity that significantly contributes to the region, which has historically been notable for its beekeeping activities in Brazil. Through the implementation of corbicular pollen collection and walking methodologies, a total of 58 species were identified, with 46 pollen types successfully classified at the species level, 8 at the

genus level, 3 at the family level, and one type remaining indeterminate. The metabarcoding analysis, conducted via the standard Oxford Nanopore protocol, revealed a lower degree of concordance with the palynological data. However, the percentage of overlap increased when the analysis was carried out against a library constructed from data gathered through the microscopic identification of pollen types. These findings do not undermine the significance of metagenomic analyses in pollen evaluation for the study of beekeeping products or services. Rather, they underscore the necessity for further investigative efforts aimed at enhancing our understanding of the species constituting the flora of interest, as well as the importance of incorporating these species into existing databases, thereby ensuring that results obtained through this technique attain greater reliability.

Conclusion

The diversity of native plants used by *Apis mellifera* found in this study reflects the richness of the flora in the Brazilian Pampa Biome and its potential to supply the region's apicultural forage. These data contribute both to the palynology of the species visited by bees and to complement environmental conservation studies to be developed in the Pampa region. Furthermore, they enable the development of management strategies that can enhance the growth of sustainable beekeeping in the area. The results obtained from the sequencing indicate that palynological analyses remain the most reliable method for detecting the botanical origin of apicultural products, especially those from regions whose vegetation genetic diversity is not fully represented in databases. Consequently, research focused on comprehending the genetic diversity of the Brazilian Pampa biome is essential. This research aims to associate more than a single marker with complementary databases that encompass this information, thereby ensuring that its biodiversity is adequately acknowledged and preserved.

Bibliography

Alvares, C. A., J. L. Stape, P. C. Sentelhas, J. D. M. Gonçalves, and G. Sparovek. 2014. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6): 711–728. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>

Álvarez, I. J. F. W., and J. F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3): 417–434. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00208-2)

Arstingstall, K. A., S. J. DeBano, X. Li, D. E. Wooster, M. M. Rowland, S. Burrows, and K. Frost. 2021. Capabilities and limitations of using DNA metabarcoding to study plant–pollinator interactions. *Molecular Ecology*, 30: 5266–5297. <https://doi.org/10.1111/mec.16112>

Baksay, S., A. Pornon, M. Burrus, J. Mariette, C. Andalo, and N. Escaravage. 2020. Experimental quantification of pollen with DNA metabarcoding using ITS1 and trnL. *Scientific Reports*, 10: 4202. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61198-6>

Baietto, A., A. Hirigoyen, J. Hernández, and A. del Pino. 2024. Litterfall production modeling based on climatic variables and nutrient return from stands of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden and *Pinus taeda* L. *Journal of Forestry Research*, 35(1), 61. <https://doi.org/10.1007/s11676-024-01706-w>

Banchi, E., C. G. Ametrano, S. Greco, D. Stanković, L. Muggia, and A. Pallavicini. 2020. PLANITS: a curated sequence reference dataset for plant ITS DNA metabarcoding. *Database*, baz155. <http://doi.org/10.1093/database/baz155>

Bänsch, S., T. Tschardtke, R. Wünschiers, L. Netter, B. Brenig, D. Gabriel, and C. Westphal. 2020. Using ITS2 metabarcoding and microscopy to analyse shifts in pollen diets of honey bees and bumble bees along a mass-flowering crop gradient. *Molecular Ecology*, 29(24): 5003–5018. <https://doi.org/10.1111/mec.15675>

Barbosa, D. B., E. F. Crupinski, R. N. Silveira, and D. C. H. Limberger. 2017. Bees and their ecosystem service of pollination. [In Portuguese] *Scientific Electronic Journal of UERGS*, 3(4): 694–703. <https://doi.org/10.21674/2448-0479.34.694-703>

Barth, M. O., and T. S. Melhem. 1988. Illustrated glossary of palynology. [In Portuguese] Publisher State University of Campinas (UNICAMP).

Barth, O. M. 2004. Melissopalynology in Brazil: A review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. *Scientia Agricola*, 61(3): 342–350. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162004000300018>

Basualdo, M., P. Cavigliasso, R. S. de Avila Jr., et al. 2022. Current situation and economic value of crops dependent on insect pollination in Latin America. *Ecological Economics*, 196: 107395. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2022.107395>

Bell, K. L., K. L. Batchelor, M. Bradford, A. McKeown, S. L. Macdonald, and D.

- Westcott. 2020. Optimisation of a pollen DNA metabarcoding method for diet analysis of flying-foxes (*Pteropus* spp.). *Australian Journal of Zoology*, 68: 273–284. <https://doi.org/10.1071/ZO20085>
- Bell, K. L., N. D. Vere, A. Keller, R. T. Richardson, A. Gous, K. S. Burgess, et al. 2016. Pollen DNA barcoding: current applications and future prospects. *Genome*. 59(9): 629-640. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0200>
- Bertrand, C., P. W. Eckerter, L. Ammann, M. H. Entling, E. Gobet, F. Herzog, L. Mestre, W. Tinner, and M. Albrecht. 2019. Seasonal shifts and complementary use of pollen sources by two bees, a lacewing and a ladybeetle species in European agricultural landscapes. *Journal of Applied Ecology*, 56: 2431–2442. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13483>
- Borges, R. L. B., J. D. Silva, and J. D. S. Nascimento. 2022. The botanical profile of bee pollen produced by *Apis mellifera* L., 1758 in an apiary located in the semi-arid region of the state of Bahia. [In Portuguese] *Paubrasilia*, v. 5, p. e85-e85. <https://doi.org/10.33447/paubrasilia.2022.e0085>
- Brugnerotto, P., D. Dortzbach, E. Blainski, et al. 2021. Identification of plants with beekeeping potential from hive monitoring systems in the state of Santa Catarina, Brazil. [In Portuguese] *Research, Society and Development* 10(7): e2710716254. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16254>
- Câmara, C. P., R. D. T. M. Ribeiro, E. G. Girão, and M. I. B. Loiola. 2021. Ethnobotanical perception associated with beekeeping: plant species with honey potential for the Potiguar Semiarid, Caatinga region, Rio Grande do Norte State, Brazil. [In Portuguese] *Hoehnea*, 48: e102021. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-10/2021b>
- Cheng, T., C. Xu, L. Lei, C. Li, Y. Zhang, and S. Zhou. 2016. Barcoding the kingdom Plantae: New PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources*, 16(1): 138–149. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12438>
- Chiara, B., F. Cavigliasso, F. Brugnerotto, P. Mariotti, A. Gennaro, S. Sforza, L. A. P. Luigi, and S. Piva. 2021. Exploring the botanical composition of polyfloral and monofloral honeys through DNA metabarcoding. *Food Control*, 128: 108175. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108175>
- Erdtman, G. 1960. The acetolysis method: A revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 54: 561–564.
- Ferreira E.A., S. Boff, S.S. Verza, and R. M. Mussury. 2021. Bioecological and Behavioral Interaction between Pollinating Bees and the Pioneer Shrub *Ludwigia nervosa* in Degraded Area Suggests an Exotic Bee as Its Major Pollinator. *Biology*, 10(2): 114. <https://doi.org/10.3390/biology10020114>
- Filgueiras, T. S., A. L. Brochado, P. E. Nogueira, and G. F. Guala. 1994. Walking: An expeditious method for qualitative floristic surveys. [In Portuguese] *Geosciences Notebooks*, 2(4): 39–43.

- Franke, H., R. Scholl, and A. Aigner. 2019. Ricin and *Ricinus communis* in pharmacology and toxicology—from ancient use and "Papyrus Ebers" to modern perspectives and "poisonous plant of the year 2018". *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 392(10), 1181–1208. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01691-6>
- Hawkins, J., N. De Vere, A. Griffith, and et al. 2015. Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: A new tool for investigating honey bee foraging preferences. *PLoS ONE*, 10(8): e0134735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134735>
- Hristov, P., R. Shumkova, N. Palova, and B. Neov. 2020. Factors associated with honey bee colony losses: A mini-review. *Veterinary Sciences*, 7(4): 166. <https://doi.org/10.3390/vetsci7040166>
- Huson, D.H., Beier, S., Flade, I., Górska, A., El-Hadidi, M., Mitra, S., et al. 2016. MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. *PLoS Computational Biology* 12(6): e1004957. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004957>
- Kassa Degu T., and G. Regasa Megerssa. 2020. Role of beekeeping in the community forest conservation: evidence from Ethiopia. *Bee World*, 97(4), 98–104. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2020.1825308>
- Klosowski, A. L. M., M. Kuasoski, and M. B. P. Bonetti. 2020. Brazilian beekeeping: Innovation and industrial property. [In Portuguese] *Journal of Agricultural Politic*, 29(1): 41–50. <https://seer.sede.embrapa.br/index.php/RPA/article/view/1461/pdf>
- Kolter, A., B. Gemeinholzer, and J. S. Boatwright. 2021. Plant DNA barcoding necessitates marker-specific efforts to establish more comprehensive reference databases. *Genome*, 64: 265–298. <https://doi.org/10.1139/gen-2019-0198>
- Lau, P., V. Bryant, and J. Rangel. 2018. Determining the minimum number of pollen grains needed for accurate honey bee (*Apis mellifera*) colony pollen pellet analysis. *Palynology*, 42: 36–42. <https://doi.org/10.1080/01916122.2017.1306810>
- Liesenfeld, V., P. Gentz, E. M. De Freitas, and S. Martins. 2019. Leaf morphology and anatomy of Asteraceae of the Pampas biome (sand-fields). *Flora*, 258, 151418. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.151418>
- Lu, J., N. Rincon, D. E. Wood, et al. 2022. Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nature Protocols*, 17: 2815–2839. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00738-y>
- Maraschin-Silva, F., A. Scherer, and L. R. M. Baptista. 2009. Diversity and structure of the herbaceous-subshrub component in secondary Atlantic Forest vegetation in southern Brazil [In Portuguese]. *Brazilian Journal of Biosciences*, 7(1): 53–65. <http://dx.doi.org/10.26848/rbgf.v16.6.p3006-3019>
- Marchi, M. M., R. L. Barbieri, J. M. Sallés, and F. A. D. Costa. 2018. Herbaceous and sub-shrub flora associated with a butiazal ecosystem in the Pampa Biome. [In Portuguese] *Rodriguésia*, 69(2): 553–560. <https://doi.org/10.1590/2175->

[7860201869221](https://doi.org/10.24824/978652512458.2)

Matiello, J., F. Granzotto, and A. P. M. Rovedder. 2022. Native ornamental plants of the Pampa biome: Potential and popularization. [In Portuguese] Publisher CRV. <https://doi.org/10.24824/978652512458.2>

Michel, T. and G. Overbeck. 2024. Review of Ecological Restoration in the Brazilian Pampa. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 96(4), e20231283. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202420231283>

Milla, L., K. Sniderman, R. Lines, M. Mousavi-Derazmahalleh, and F. Encinas-Viso. 2021. Pollen DNA metabarcoding identifies regional provenance and high plant diversity in Australian honey. *Ecology and Evolution*, 11(13): 8683–8698. <https://doi.org/10.1002/ece3.7679>

Minuzzi, J. D. O. 2022. Exotic species in the Pampa Biome and their impacts recorded by travelers during the XIX century. [In Portuguese]. Proceedings of the State History Meeting. Santa Catarina. https://www.encontro2022.sc.anpuh.org/resources/anais/16/anpuh-sc-eeh2022/1663383490_ARQUIVO_9d94f93b9736cae3158b9521bdf954ef.pdf

Moorhouse-Gann, R. J., J. C. Dunn, N. de Vere, M. Goder, N. Cole, H. Hipperson, and W. O. C. Symondson. 2018. New universal ITS2 primers for high-resolution herbivory analyses using DNA metabarcoding in both tropical and temperate zones. *Scientific Reports*, 8: 8542. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26648-2>

Mota, A. V., G. N. Trindade, T. S. Toledo, and K. M. Cardinal. 2023. Thermoregulation of bees with emphasis on *Apis mellifera*. [In Portuguese] *Animal Science: Current topics in research* (Vol. 2, pp. 227–239). <https://dx.doi.org/10.37885/230211947>

Oddie, M. A. Y., and B. Dahle. 2024. One for all and all for one: A review on the commonality of risk to honeybees and wild pollinators and the benefits of beekeepers in conservation. *Frontiers in Bee Science*, 2: 1305679. <https://doi.org/10.3389/frbee.2024.1305679>

Papa, G., R. Maier, A. Durazzo, et al. 2022. The honey bee *Apis mellifera*: An insect at the interface between human and ecosystem health. *Biology*, 11(2): 233. <https://doi.org/10.3390/biology11020233>

Pornon, A., N. Escaravage, M. Burrus, H. Holota, A. Khimoun, J. Mariette, C. Pellizzari, A. Iribar, R. Etienne, P. Taberlet, M. Vidal, P. Winterton, L. Zinger, and C. Andalo. 2016. Using metabarcoding to reveal and quantify plant-pollinator interactions. *Scientific Reports*, 6: 27282. <https://doi.org/10.1038/srep27282>

Punt, W., P. P. Hoen, S. Blackmore, S. Nilsson, and A. Le Thomas. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 143(1–2): 1–81. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2006.06.008>

Radaeski, J. N., C. I. Silva, and S. G. Bauermann. 2019. Melissopalynology in Rio Grande do Sul: Review and characterization of potential botanical species for beekeeping and meliponiculture. [In Portuguese] *Acta Biológica Catarinense*, 6(2): 63–75. <https://periodicos.univille.br/ABC/article/download/221/187>

- Requier, F., M. S. Leyton, C. L. Morales, L. A. Garibaldi, et al. 2024. First large-scale study reveals important losses of managed honey bee and stingless bee colonies in Latin America. *Scientific Reports*, 14(1): 10079. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59513-6>
- Richardson, R. T., T. D. Eaton, C. H. Lin, G. Cherry, R. M. Johnson, and D. B. Sponsler. 2021. Application of plant metabarcoding to identify diverse honeybee pollen forage along an urban–agricultural gradient. *Molecular Ecology*, 30: 310–323. <https://doi.org/10.1111/mec.15704>
- Richardson, R. T., Lin, H., Sponsler, D. B., Quijia, J. O., Goodell, K., and Johnson, R. M. 2015. Application of ITS2 metabarcoding to determine the provenance of pollen collected by honey bees in an agroecosystem. *Applications in Plant Sciences*, 3(1), apps.1400066. <https://doi.org/10.3732/apps.1400066>
- Salgado-Labouriau, M. L. 1973. Contribution to the palynology of the cerrados. Brazilian Academy of Sciences. Rio de Janeiro, pp. 291.
- Sandini, T. M., M. S. B. Udo, and H. S. Spinosa. 2013. Senecio brasiliensis and pyrrolizidine alkaloids: Toxicity in animals and human health. *Biotemas*, 26(2): 83–92. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2013v26n2p83>
- Silva, I. M. and S. C. M. Barbalho. 2024. Innovation in Beekeeping: A Literature Review under Brazilian Background. *IEOM Society International*, USA, 2024. <https://doi.org/10.46254/SA05.20240076>
- Silva, A. L. G. D., and M. C. D. Pinheiro. 2007. Floral biology and pollination of four species of Eugenia L. (Myrtaceae). [In Portuguese] *Acta Botanica Brasilica*, 21(1): 235–247. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062007000100022>
- Silveira, D. C. D., P. B. Maracajá, R. A. D. Silva, R. M. Sousa, and B. Soto-Blanco. 2015. Diurnal and seasonal variations in the defensiveness of Africanized honeybees (*Apis mellifera* L.). [In Portuguese] *Brazilian Journal of Animal Health and Production*, 16(4): 925–934. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402015000400016>
- Souza, C. S., P. K. Maruyama, K. C. B. S. Santos, I. G. Varassin, C. L. Gross, and A. C. Araujo. 2021. Plant-centred sampling estimates higher beta diversity of interactions than pollinator-based sampling across habitats. *The New Phytologist*, 230: 2501–2512. <https://doi.org/10.1111/nph.17334>
- Stumpf, E. R. T., R. L. Barbieri, and G. Heiden. 2009. Colors and shapes in the Pampa Biome: Native ornamental plants. [In Portuguese] Embrapa Temperate Climate. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/747332>
- Valese, A. C., H. Dagher, C. M. O. Muller, et al. 2021 Quantification of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio brasiliensis*, beehive pollen, and honey by LC-MS/MS. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, 56(7): 685–694. <http://doi.org/10.1080/03601234.2021.1943257>
- Vasconcelos, E. C. G., V. L. Silva, N. J. Bendini, J. B. Costa, and D. N. Carvalho. 2021. Floristic diversity of species with beekeeping potential in the municipality of Cocal, northern Piauí. *Brazilian Journal of Agroecology and Sustainability*, 3(1): 1–

10. <https://doi.org/10.52719/bjas.v3i1.3955>

Vidal, M. G., N. S. Santana, and D. Vidal. 2008. Bee flora and apiary management in the Recôncavo Sul region of Bahia. [In Portuguese] *Academic Journal: Environmental Agricultural Science*, 6(4): 503–509. <https://doi.org/10.7213/cienciaanimal.v6i4.11636>

Wirta, H., N. Abrego, K. Miller, T. Roslin, and E. Vesterinen. 2021. DNA traces the origin of honey by identifying plants, bacteria and fungi. *Scientific Reports*, 11(1): 4798. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84174-0>

Witter, A. P. W., D. Werkhausen, D. Nalin, M. L. O. Freitas, et al. 2023. Resistance of *Amaranthus hybridus* population to imazethapyr. *Revista de Gestão Social e Ambiental*, 17(9): 1–14. <http://doi.org/10.24857/rgsa.v17n9-008>

Wolff, L. F. 2018a. Honey production system for the southern region of Rio Grande do Sul (Sistemas de Produção, 26). [In Portuguese] Embrapa Clima Temperado. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1104382/1/Sistema26web.pdf>

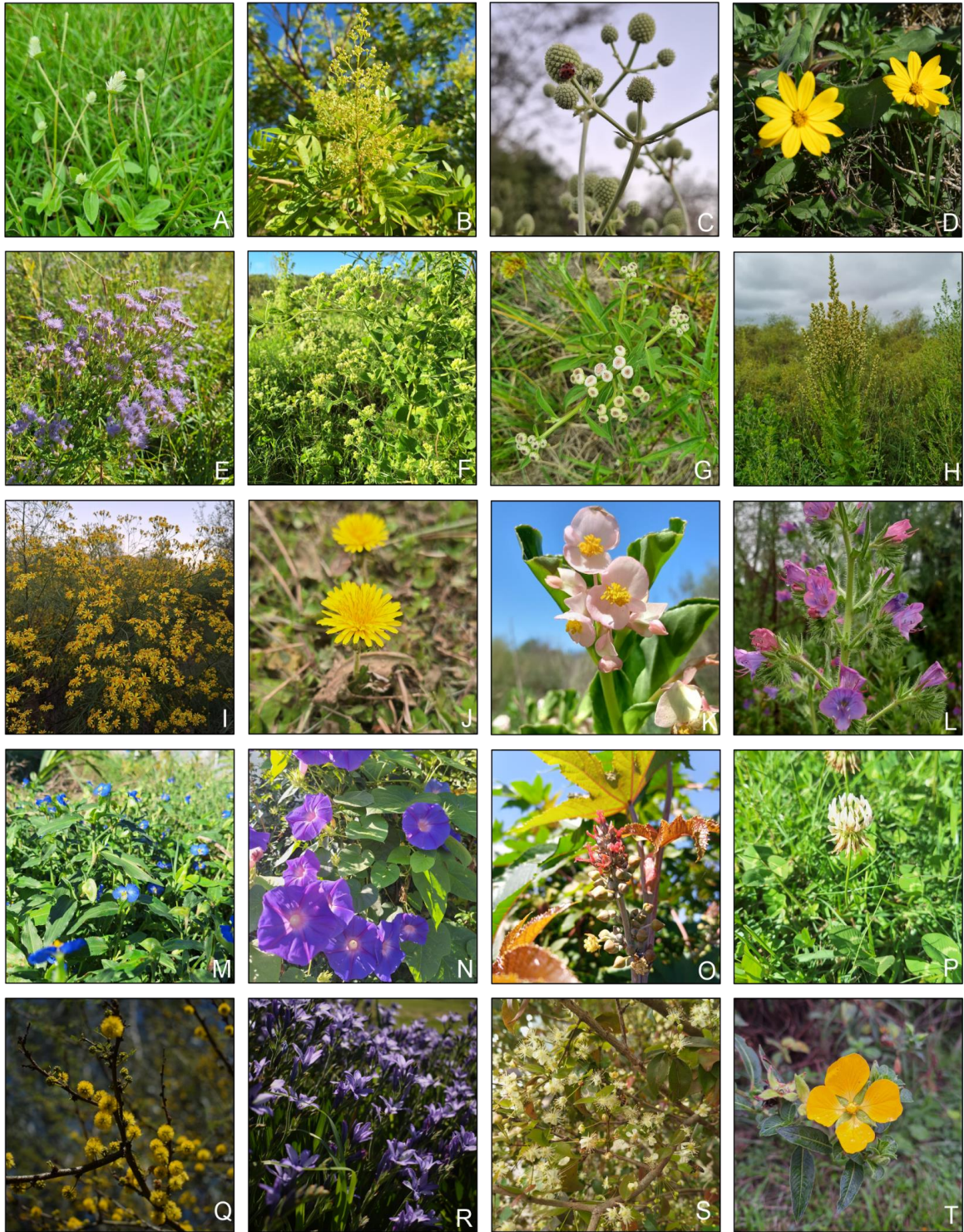
Wolff, L. F. 2018b. Participatory construction of bee flowering calendars in the southern region of RS [In Portuguese]. Embrapa Temperate Climate.. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1101751>

Wolff, L. F., G. Schnell and G. S. E. Schuhli. 2021. Eucalyptus and bees. [In Portuguese] In *Eucalyptus and Embrapa* (pp. 685-670). Embrapa. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1132426/1/EmbrapaFlorestas-2021-LV-EucaliptoEmbrapa-cap16.pdf>

4. INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

Durante as caminhadas destinadas à observação de campo e coleta de material botânico, foram realizados registros fotográficos das flores visitadas por *Apis mellifera*. Esses registros servirão de base para a elaboração de um catálogo ilustrado de plantas apícolas do bioma Pampa, o qual reunirá imagens das flores acompanhadas de seus respectivos grãos de pólen. Com o objetivo de ilustrar parte desse material, algumas dessas fotografias serão apresentadas a seguir (Figura 3).

Figura 3- Imagens de algumas das espécies visitadas por *Apis mellifera* na área de estudo: (A) *Alternanthera philoxeroides*; (B) *Schinus terebinthifolia*; (C) *Eryngium horridum*; (D) *Aspilia montevidensis*; (E) *Chromolaena hirsuta*; (F) *Mikania micranta*; (G) *Pluchea sagittalis*; (H) *Pterocaulon polystachyum*; (I) *Senecio brasiliensis*; (J) *Taraxacum officinale*; (K) *Begonia cucullata*; (L) *Echium plantagineum*; (M) *Commelina erecta*; (N) *Ipomoea purpúrea*; (O) *Ricinus communis*; (P) *Trifolium repens*; (Q) *Vachellia caven*; (R) *Babiana angustifolia*; (S) *Eugenia uniflora*; (T) *Ludwigia peruviana*.



Fonte: Autoria própria

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados neste estudo foram muito satisfatórios, pois enfatizam a riqueza vegetal presente no Bioma Pampa brasileiro e seu potencial de suprir o pasto apícola; além disso, reforça o papel ecológico das plantas nativas. A partir da divulgação dos dados obtidos, é possível que apicultores explorem racionalmente suas áreas de produção, desenvolvendo estratégias para a construção de sistemas cada vez mais agroecológicos, que integrem abelhas e meio ambiente para benefícios mútuos.

Os recursos utilizados por *Apis mellifera* também são fonte de alimento para espécies de polinizadores nativos e, desse modo, investir na diversificação vegetal das áreas de apicultura é uma responsabilidade ambiental que não apenas favorece os apicultores, pela oferta nutricional de qualidade para suas abelhas manejadas, como também garante recursos para outras espécies.

Para que isso seja possível, é essencial o conhecimento acerca das particularidades do ecossistema em que tais atividades se desenvolvem e o compartilhamento dessas informações com as partes interessadas. Desse modo, é necessário que cada vez mais estudos como este sejam realizados, visando conhecer a vegetação nativa do Bioma Pampa e como se dão as dinâmicas de uso dos recursos pelos polinizadores.

Com relação aos métodos utilizados, a partir da comparação das análises feitas, constatou-se a força combinada da palinologia e das análises moleculares no avanço da apicultura sustentável e das estratégias de conservação ambiental. Fica clara a necessidade de desenvolvimento de pesquisas com foco em ampliar bancos de dados genômicos para a inclusão da diversidade genética de biomas da América Latina, como o bioma Pampa.

Com os dados obtidos está sendo desenvolvido um catálogo polínico que inclui imagens das plantas visitadas por *Apis mellifera* e seus respectivos grãos de pólen. Deste modo, se almeja que o conhecimento gerado seja compartilhado de forma clara e acessível, especialmente para os apicultores locais. Além disso, as lâminas permanentes de grão de pólen, produzidas para as análises palinológicas, serão depositadas no herbário da UNIPAMPA (HBEI), onde estarão disponíveis para consulta, constituindo um valioso acervo que poderá contribuir para o

desenvolvimento de pesquisas futuras.

5. REFERÊNCIAS

AGUIAR, Diana; WERNER, Deborah. Infraestrutura e Finanças Verdes: Notas Sobre o Caso Brasileiro. **Finanças verdes no Brasil: perspectivas multidisciplinares sobre o financiamento da transição verde** 2022, 1: 205-232.

ALMEIDA, Daniela de *et al.* Plantas visitadas por abelhas e polinização. ESALQ-Divisão de Biblioteca e Documentação. 2003.

ALMEIDA, Lucilene de Mattos. **Validação de Método de Manejo para Maximizar a Produtividade Apícola na Região do Pampa Gaúcho**.2024. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Pampa- Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, São Gabriel, 2024.

BARTH, Monica Ortrud. O Pólen no mel brasileiro. Rio de Janeiro: Editora Luxor, 151p. 1989.

BARTH, Monica Ortrud. Melissopalynology in Brazil: A review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Sci. Agric.** 2004, 61, 342–350.
<https://doi.org/10.1590/S0103-90162004000300018>

BARTH, Monica Ortrud, MISUMI, Shana Yuri. Morfologia do polen de plantas essencialmente arboreas do Brasil meridional. Parana: Editora Atena, Ponta Grossa. 2023 <https://doi.org/10.22533/at.ed.749231906>.

BARTH, O. M.; MUNHOZ, M.C.; LUZ, C.F.P. Botanical origin of Apis pollen loads using color, weight and pollen morphology data. *Acta Alimentaria*, v.38, n. 1, p.133-139, 2009.

BAUMUNG, R. *et al.* Good beekeeping practices and the pillars for sustainable production. **Good beekeeping practices for sustainable apiculture**. FAO Animal Production and Health Guidelines No. 25. 5-6, 267p. 2021.
<https://doi.org/10.4060/cb5353en>

BAVA, Roberto *et al.* Hive products: composition, pharmacological properties, and therapeutic applications. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 5, p. 646, 2024.<https://doi.org/10.3390/ph17050646>

BELL, Karen L. *et al.* Quantitative and qualitative assessment of pollen DNA metabarcoding using constructed species mixtures. **Molecular Ecology**, 28(2), 2019, 431-455. <https://doi.org/10.1111/mec.14840>

BELL, Karen L. *et al.* Pollen DNA barcoding: current applications and future prospects. **Genome**. 59(9): 629-640, 2016. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0200>

BORGES, Ricardo Landim Bormann; DA SILVA, Jéssica; DOS SANTOS NASCIMENTO, Jusciara. Perfil botânico do pólen apícola produzido por *Apis mellifera* L., 1758 em um apiário localizado no semiárido baiano. **Paubrasilia**, v. 5, p. e85-e85, 2022. <https://doi.org/10.33447/paubrasilia.2022.e0085>

BRONDÍZIO, Eduardo Sonnewend *et al.* Global assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. IPBES secretariat, Bonn, Germany. p. 1144. 2019. ISBN: 978-3-947851-20-1

CARO, Tim *et al.* An inconvenient misconception: Climate change is not the principal driver of biodiversity loss. **Conservation Letters**, 15(3), e12868, 2022. <https://doi.org/10.1111/conl.12868>

CHIARA, Beltramo *et al.* Exploring the botanical composition of polyfloral and monofloral honeys through DNA metabarcoding. **Food Control**, 128, 108175. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108175>

CORREIA, Francisco Cildomar da Silva; FRANCISCO, Reginaldo da Silva; PERUQUETTI, Rui Carlos. Palinologia e a interação planta abelha: Revisão de literatura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia** da UNIPAR, Umuarama, 20: 247-251, 2017.

DA SILVA, Isabella Mendes; BARBALHO, Sanderson César Macêdo. Innovation in Beekeeping: A Literature Review under Brazilian Background. **IEOM Society International**, USA, 2024. <https://doi.org/10.46254/SA05.20240076>

DA SILVA, Luciano Pereira; JUNIOR, Edemar Ferrarezi. As abelhas e sua relevante importância no processo de polinização. **Revista Interface Tecnológica**, v. 19, n. 1, p. 248-259, 2022.

DANTAS, Tereza Cristina David *et al.* Produtos apícolas e seu uso crescente na atualidade. **Journal of Agroindustry Systems**, v. 7, n. 1, p. 225–233-225–233, 2024.

DAUGALIYEVA, Saule *et al.* Foraging of Honeybees from Different Ecological Areas Determined through Melissopalynological Analysis and DNA Metabarcoding. **Insects**, 15(9), 674. 2024 <https://doi.org/10.3390/insects15090674>

DI PASQUALE, G., C. Alaux, Y. Le Conte, *Et al.* Variations in the availability of

pollen resources affect honey bee health. *PloS one*, 11(9), e0162818. 2016
DOI:10.1371/journal.pone.0162818.

DI PASQUALE, Garance *et al.* Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter? **PloS One**, 8. 0072016 e72016. 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone>.

DINIZ, Maria Rodrigues; RÊGO, Marcia Maria Corrêa; ALMEIDA JR., Eduardo Bezerra de. **Plantas apícolas: conhecimento das espécies ocorrentes no município de Tutóia, Maranhão**. Biodiversidade do meio Norte do Brasil: conhecimentos ecológicos e aplicações, p. 135-150. 2020.

DOMINGUES, Higor Antonio; BITAR, Norma Aparecida Borges. Implantação de uma palinoteca no herbário *Mandevilla sp.* **Perquirere**, v. 2, n. 11, p. 238-253, 2014.

DORETO, Hanay dos Santos. **Forrageamento estacional da *Apis mellífera L., 1758 (Hymenoptera: Apidae)* e Identificação da Florada Apícola de Importância Nectífera e Polinífera em Jaboticabal, São Paulo, Brasil**. 2019. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal. 2019.

ERDTMAN, Gunnar. Pollen Morphology and Plant Taxonomy, 539 pp., **The Chronical Botanica** Co, Waltham, Mass., U.S.A, 1952.

ERDTMAN, Gunnar. The acetolysis method in a revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift* 54:561-564, 1960.

ETXEGARAI-LEGARRETA, Olatz; SANCHEZ-FAMOSO, Valeriano. The role of beekeeping in the generation of goods and services: The interrelation between environmental, socioeconomic, and sociocultural utilities. **Agriculture**, v. 12, n. 4, p. 551, 2022. <https://doi.org/10.3390/agriculture12040551>

FILIPIAK, Michael *et al.* Ecological stoichiometry of the honeybee: Pollen diversity and adequate species composition are needed to mitigate limitations imposed on the growth and development of bees by pollen quality. **PLOS ONE**, 12(8), 2017, e0183236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183236>

GASPARINO, Eduardo C.; CRUZ-BARROS, Maria Amélia V. Palinologia. **Curso de capacitação de monitores e educadores**. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. São Paulo, Instituto de Botânica, p.9 2006.

GORROI, Geovani *et al.* Apicultura: o manejo das abelhas do gênero *Apis*. Apicultura. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte 119p. 2020.

- GUPTA, Rakesh Kumar *et al.* History of beekeeping in developing world. In: **Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security**. Springer, Dordrecht, p. 3-62., 2014.
- HALVACI, Ebru *et al.* “Journey to the Sweet World of Beekeeping: Historical Development, Honey Harvesting and Overview of Bee Products”. **Journal of Scientific Reports-B** 009, 39-58, 2024.
- HEBER, Luiz Pereira. Apicultura Contemporânea. **Apicultura** [livro eletrônico] / Curitiba : SENAR AR/PR, 2023.
- HERRERA, Carlos M. Gradual replacement of wild bees by honeybees in flowers of the Mediterranean Basin over the last 50 years. *Proc. Biol. Sci.* 287, 20192657.2020. doi: 10.1098/rspb.2019.2657
- KHALIFA, Shaden AM *et al.* Overview of Bee Pollination and Its Economic Value for Crop Production. **Insects**, 12(8), 688., 2021. <https://doi.org/10.3390/insects12080688>
- KOVÁCS-HOSTYÁNSZKI, Anikó *et al.* Ecological intensification to mitigate impacts of conventional intensive land use on pollinators and pollination. **Ecol. Lett.** 20: 673–689, 2017. <https://doi.org/10.1111/ele.12762>
- KRITSKY, Gene. Beekeeping from antiquity through the middle ages. **Annual Review of Entomology**, v. 62, n. 1, p. 249-264, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035115>
- LIMA-RIBEIRO, Matheus de Souza e BARBIERI, Maira. Análise palinológica: fundamentos e perspectivas na Pesquisa Arqueológica. **Habitus** 3: 261-290, 2005.
- LIU, Mingxin *et al.* A practical guide to DNA metabarcoding for entomological ecologists. **Ecological Entomology**, 45(3), 373-385, 2019. <https://doi.org/10.1111/een.12831>
- LOPES, Ariadina Valentina *et al.* Neglected diversity of crop pollinators: Lessons from the world’s largest tropical country. **Perspectives in Ecology and Conservation**, 19(4), 500-504, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2021.06.004>
- LOPES, Maria Teresa do Rêgo *et al.* **Pólen apícola Características da produção e da qualidade**. Teresina : Embrapa Meio-Norte, 2022. PDF (65 p.) (Documentos / Embrapa Meio-Norte, ISSN 0104-866X ; 283).
- MALAGNINI, Valeria. Seasonality and Landscape Composition Drive the Diversity of Pollen Collected by Managed Honey Bees. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, 6, 865368. 2022. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.865368>
- MALLINGER, Rachel E., GAINES-DAY, Hannah R., GRATTON, Cláudio. Do

managed bees have negative effects on wild bees?: A systematic review of the literature. *PloS One* 12, e0189268. 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0189268

MARQUES, Luiz Júnior Pereira *et al.* Levantamento da flora apícola em Santa Luzia do Paruá, Sudoeste da Amazônia, Maranhão. **Acta Botanica Brasilica**, 25, 141-149, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062011000100017>

MARQUES, Marta Inêz Medeiros. **Financiamento Ambiental, Mudanças Climáticas e o Agronegócio no Brasil**. Finanças verdes no Brasil: perspectivas multidisciplinares sobre o financiamento da transição verde. Tomaso (ed.). 143-170. São Paulo: Blucher, 2022. <http://dx.doi.org/10.5151/9786555502480-06>

MARTINHO, C. *et al.* Apicultura: revisão de literatura. **Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária**, v. 12, p. 1-17, 2022.

MERDAN, Kurtuluş. Analysis of bee products in terms of global production, consumption, and international trade. **Research & reviews in agriculture, forestry and aquaculture sciences-ii**, p. 111, 2021.

MRAMBA, Rosemary Peter. The role of plant diversity and density in the availability of foral resources for effective pollination and honey production by the honey bee (*Apis mellifera*) in arid areas. **Discover Plants**, v. 2, n. 1, p. 65, 2025. <https://doi.org/10.1007/s44372-025-00154-y>

NORDI, João Carlos. **Usos e aplicações dos produtos apícolas como apiterápicos**. 1ª Edição, João Carlos Nordi. Taubaté: UNITAU, 70f, 2014.

ODDIE, Melissa A. Y. e DAHLE, Bjorn. One for all and all for one: A review on the commonality of risk to honeybees and wild pollinators and the benefits of beekeepers in conservation. **Frontiers in Bee Science**, 2, 1305679, 2024. <https://doi.org/10.3389/frbee.2024.1305679>

OLATE-OLAVE, Verónica Rachel *et al.* Bee health and productivity in *Apis mellifera*, a consequence of multiple factors. **Veterinary Sciences** 8(5):76, 2021. <https://doi.org/10.3390/vetsci8050076>

OLIVEIRA, R. R. M. *et al.* **Manual para o monitoramento de Biodiversidade por meio de DNA ambiental (eDNA metabarcoding)**. Belém: 2023. (Relatório Técnico N024/2023) DOI 10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2023.24.

PAPA, Júlia *et al.* The honey bee *Apis mellifera*: An insect at the interface between human and ecosystem health. **Biology**, v. 11, n. 2, p. 233, 2022. <https://doi.org/10.3390/biology11020233>

PEREIRA, Fábila de Mello *et al.* **Sistema de Produção de Mel**. Distrito Federal: EMBRAPA, p.78, 2023.

Projeto MapBiomias- 2022. Coleção 7. [Em Português] Da Série Anual de Mapas de Cobertura e Uso Anual da Terra do Brasil, acessado em 15 de fevereiro de 2025, <https://brasil.mapbiomas.org/2022/10/13/pampa-passa-por-profundas-transformacoes-e-esta-cada-vez-mais-distante-de-sua-configuracao-original/>

REIS, Hélio Souza Dos *et al.* Floristic characterization and pollen morphology of plants visited by *Apis mellifera* L. in caatinga areas in Bahia, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, 37, 1-21, 2023. <https://doi.org/10.1590/1677-941X-ABB-2022-0264>

REQUIER, Fabrice *et al.* First large-scale study reveals important losses of managed honey bee and stingless bee colonies in Latin America. **Scientific Reports**, 14(1), 10079, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59513-6>

RICHARDSON, Rodney T. *et al.* Application of ITS2 metabarcoding to determine the provenance of pollen collected by honey bees in an agroecosystem. **Applications in plant sciences**, v. 3, n. 1, p. 1400066, 2015.

SALGADO-LABOURIAU, Maria Léa. Contribuição à palinologia dos cerrados. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, Brazil. 293 p., 1973.

SANTOS, Charles Fernando dos; OTESBELGUE, Alex e BLOCHTEIN, Betina. The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. **PLOS ONE**, 13(7), e0200286, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200286>

SANTOS, Rafael Francisco; KIILL, Lúcia Helena Piedade; ARAÚJO, José Lincoln Pinheiro. Levantamento da flora melífera de interesse apícola no município de Petrolina-PE. **Revista Caatinga**, Mossoró 19(3). 19: 221-227, 2006.

SEBRAE. Apicultura Gaúcha. 2021. Disponível em: <https://sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/galeriavideo/apicultura-gaucha,5ff6e89c14ef7710VgnVCM100000d701210aRCRD>. Acesso em 16 de fevereiro de 2025.

SILVA, Silvio José et al. Espécies vegetais utilizadas como pasto apícola por abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) em área de savana de Roraima, Brasil. **Boletim do Museu Integrado de Roraima (Online)**, v. 14, n. 01, p. 50-61, 2021.

SIMÃO, Taiz Leonor Lopes. **Caracterização por DNA metabarcoding da biodiversidade de ambientes neotropicais: investigação das comunidades presentes em fitotelmos de bromélias e sedimentos marinhos**. 2016. Tese de Doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Zoologia, 2016.

SINGH, Nabdeep *et al.* Beekeeping: A Scientific Approach to Biodiversity

Conservation and Pollinator Protection. **Scope**. 14 (4), 2024.

SMART, MD et al. A Comparison of Honey Bee-Collected Pollen From Working Agricultural Lands Using Light Microscopy and ITS Metabarcoding. **Environmental Entomology**. Feb 1;46(1):38-49, 2017. <https://doi.org/10.1093/ee/nvw159>

TAMAME, Maria Angélica e MUIÑO, Walter Alejandro. **Plantas de importancia apícola en La Pampa**. 1a ed - Santa Rosa : Editorial de la Universidad Nacional de La Pampa, 2024.

TREVISAN, Adriana Carla Dias *et al.* Bioma Pampa, Desafios e Oportunidade de Implementação do Código Florestal. Observatório do Código Florestal. Editora Amigos da Terra, 2020.

TREVISOL, Graciela *et al.* Panorama econômico da produção e exportação de mel de abelha produzidos no Brasil. **Revista de Gestão e Secretariado**, v. 13, n. 3, p. 352-368, 2022. <http://dx.doi.org/10.7769/gesec.v13i3.1>

ULLAH, Saed *et al.* Using pollen DNA metabarcoding to trace the geographical and botanical origin of honey from Karangasem, Indonesia. **Heliyon**, v.10, Issue 12e33094, June 30, 2024.

VELARDI, Sara. "You treat them right, They'll treat you right": Understanding beekeepers' scale management decisions within the context of bee values. **Journal of Rural Studies**, 81, 27-36, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2020.12.002>

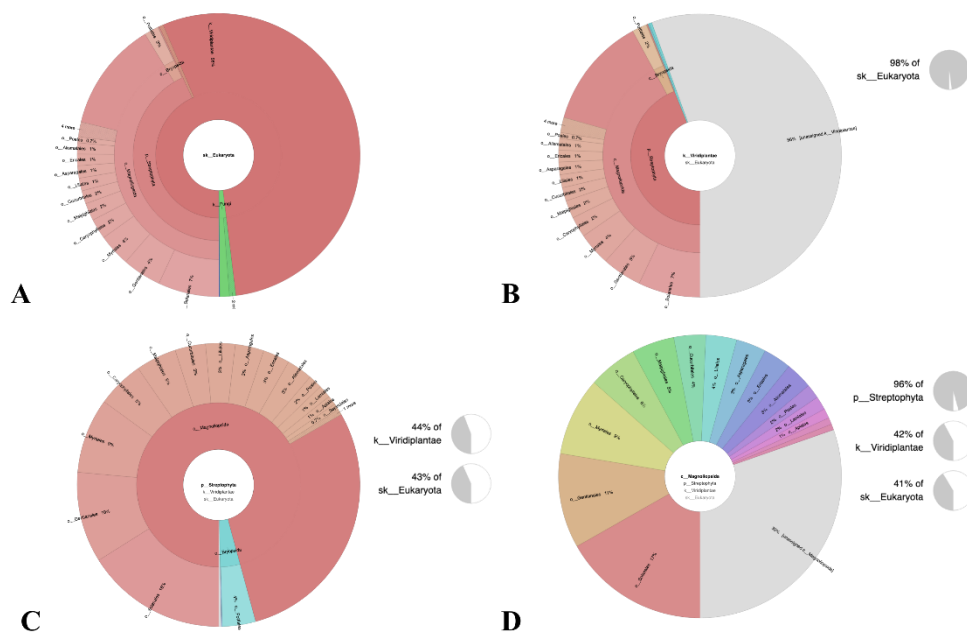
VIEIRA, Maria Rita Mendonça; JUNIOR, Marcos Vinícius Campelo; ZANON, Angela Maria. Desenvolvimento sustentável e crise ambiental: novos percursos da ecologia política. **Revista Sapiência: Sociedade, Saberes e Práticas Educacionais**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2021. Disponível em: <https://www.revista.ueg.br/index.php/sapiencia/article/view/11069>.

WIZENBERG, Sidney B. *et al.* Validating a multi-locus metabarcoding approach for characterizing mixed-pollen samples. **Plant Methods** 19, 120, 2023. <https://doi.org/10.1186/s13007-023-01097-9>

WOLFF, Luis Fernando. **Sistema de produção de mel para a região Sul do Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 10 p. (Embrapa Clima Temperado. Sistemas de produção, 26), 2018.

WOLFF, Luis Fernando; WINKEL, Tiele Felsch; BEZERRA, Antonio J. Amaral. **Base da cadeia produtiva do mel na região sul do RS quanto ao impacto econômico e social de projeto de desenvolvimento territorial**. Boletim / Embrapa Clima Temperado, ISSN 1678-2518 ; 286, 2018.

7. MATERIAL SUPPLEMENTAR



Supplementary Figure 1 – **KRONA Diagrams Illustrating Taxonomy Assignments of ITS Reads from Corbicular Pollen Metabarcoding in a Pampa Biome Apiary.** This figure comprises four KRONA diagrams showing the taxonomic distribution of ITS reads from pollen collected by *Apis mellifera* in the Brazilian Pampa Biome. (A) Displays all taxonomy assignments, revealing a high proportion of unassigned reads (50%), with Viridiplantae (30%) as the dominant assigned group, followed by Fungi (10%) and Bryophyta (5%). (B) Zooms into Viridiplantae, highlighting Streptophyta (90%) as the primary subgroup, with Chlorophyta contributing 5%. (C) Focuses on Streptophyta, where Magnoliopsida (angiosperms) dominate at 85%, followed by Bryophyta (10%). (D) Details Magnoliopsida, showing Asterales (30%) as the most abundant order, primarily driven by Asteraceae, alongside Myrtales (20%) and Gentianales (15%). These diagrams illustrate the progressive

taxonomic refinement from broad assignments to angiosperm-specific profiles, emphasizing the prevalence of Asteraceae in the pollen collected by *A. mellifera* and the significant presence of unassigned reads in the initial analysis.

Supplementary Figure 2 – **Cladogram Based on taxonomical assigns of ITS Regions Showing OTUs Identified by Kraken from a Preliminary Corbicular Pollen Metabarcoding Analysis in a Pampa Biome Apiary.** This cladogram illustrates a preliminary taxonomic analysis of pollen collected by *Apis mellifera* in the Brazilian Pampa Biome, grouped into major clades (e.g., Asterids, Rosids, Fabids, Malvids, Commelinids, Pentapetalae, Mesangiospermae, and others Spermatophyta). The level of box filling in green indicates the relative frequency of each operational taxonomic unit (OTU), with more filled boxes representing higher frequency. The most frequent OTUs, indicated by the most filled boxes, include *Acicarpa tribuloides*, *Apium* spp., *Brassica* spp., *Eucalyptus* spp. and *Eugenia* spp. However, this preliminary analysis using Kraken identified several OTUs as noise, reflecting potential contamination or misclassification, which underscores the need for further refinement in the metabarcoding pipeline to accurately characterize the floral resources available to honeybees in the Pampa Biome.