



Universidade Federal de Goiás

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal



**DISTILIA EM *FARAMEA MULTIFLORA* EM UM FRAGMENTO DE FLORESTA NO
BIOMA CERRADO**

DANILO LUIZ LOPES

Goiânia – 2016

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:


Nome completo do autor: **DANILO LUIZ LOPES**

Título do trabalho: **DISTILIA EM *FARAMEA MULTIFLORA* EM UM FRAGMENTO DE FLORESTA NO BIOMA CERRADO**

3. Informações de acesso ao documento:


Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 02 / 08 / 2019

DANILO LUIZ LOPES

**DISTILIA EM *FARAMEA MULTIFLORA* EM UM FRAGMENTO DE FLORESTA NO
BIOMA CERRADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro

Goiânia – 2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Lopes, Danilo Luiz
DISTILIA EM FARAMEA MULTIFLORA EM UM FRAGMENTO DE FLORESTA NO BIOMA CERRADO [manuscrito] / Danilo Luiz Lopes. 2016.
55 f.

Orientador: Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal, Goiânia, 2016.
Bibliografia.
Inclui gráfico, tabelas.

1. Heterostilia. 2. Autocompatibilidade. 3. Aptidão reprodutiva. 4. Dimorfismo polínico. I. Consolaro, Hélder Nagai, orient. II. Título.

CDU 581.16



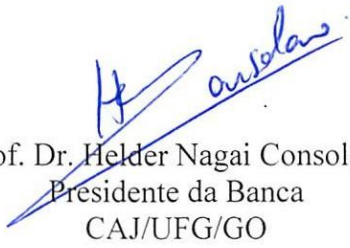
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE VEGETAL

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 034

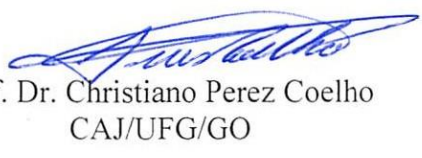
ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO. – Aos vinte e oito dias do mês de março do ano de dois mil e dezesseis (28/02/2016), às 09h00min horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Prof. Dr. Helder Nagai Consolaro – orientador, Prof. Dr. Christiano Perez Coelho e Profa. Dra. Edivani Villaron Franceschinelli para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas II, procederem à avaliação da defesa de Dissertação intitulada “*DISTILIA EM Faramaea multiflora* EM UM FRAGMENTO DE FLORESTA NO BIOMA CERRADO” em nível de mestrado, área de concentração em Botânica, de autoria de **DANILO LUIZ LOPES**, discente do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida ao autor da dissertação que, em 50 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 1283/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC) - que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal - e procedidas às correções recomendadas, a Dissertação foi aprovada por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Vegetal, na área de concentração em Botânica pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGBV da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções, em trinta dias a contar da data da defesa. A banca examinadora recomenda a publicação de artigo(s) científicos oriundos dessa dissertação em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de procedidas

36 as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades de pauta, às 12:18 horas a
37 presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado e para constar eu,
38 Gleizilene Braz Pereira dos Santos, Assistente em Administração do Instituto de Ciências
39 Biológicas da Universidade Federal de Goiás lavrei a presente Ata, que após lida e aprovada, será
40 assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.


41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



Prof. Dr. Helder Nagai Consolaro
Presidente da Banca
CAJ/UFG/GO



Prof. Dr. Christiano Perez Coelho
CAJ/UFG/GO



Edivani V. Franceschinelli
Profa. Dra. Edivani Villaron Franceschinelli
ICB/UFG/GO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a minha noiva, **Renata**, por todo o suporte nesse período de aprendizagem e construção, agradeço principalmente por me suportar, pela paciência e carinho imensuráveis. Te amo muito!!!

Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro** por todo apoio, pela imensa paciência, e pela enorme contribuição nesse trabalho. O meio acadêmico precisa de mais orientadores como você. Muito Obrigado mesmo!!!

Meus agradecimentos ao **Anderson**, parceiro de campo e laboratório, esse trabalho é nosso. Muito Obrigado.

Aos 'filhos' do Hélder: **Marco Túlio, Rafael e Túlio**. Agradeço muito pela amizade. Aprendi muito com vocês, espero sempre trabalhar com pessoas assim. Foi uma tremenda satisfação.

Aos meus amigos e familiares.

Agradeço a turma do mestrado, pelo companheirismo nas disciplinas.

Ao **Laboratório de Biologia Reprodutiva** da Universidade Federal de Goiás (Catalão), por disponibilizar equipamentos para todas as análises laboratoriais.

Aos membros da banca que aceitaram participar desse processo.

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da bolsa de estudo.

INTRODUÇÃO GERAL

A grande diversidade de espécies de Angiospermas têm sido frequentemente relacionada com a extraordinária variedade de suas estruturas reprodutivas, as flores (Barrett 2002). Muitas características vegetais, como a morfologia floral, vêm sendo estudadas para compreender o seu significado adaptativo e entender melhor o processo evolutivo que levou a grande diversidade de formas e estruturas nas mais diversas famílias de plantas, principalmente dentre as Angiospermas (Raven *et al.* 1996). Dentro dessas estratégias, foram descritas muitas espécies que apresentam indivíduos com flores distintas, no que diz respeito a diferenças na posição de seus órgãos sexuais para diminuir as chances de autopolinização. Tendo em vista que a autopolinização está, normalmente, associada com a depressão endogâmica, muitas flores apresentam a disposição de estigmas e anteras de forma a favorecer a ocorrência da polinização cruzada, evitando os efeitos da endogamia nestas espécies (Ganders 1979, Charlesworth & Charlesworth 1987).

Uma das formas de se evitar a autopolinização é a separação espacial entre anteras e estigmas dentro da flor, característica essa conhecida como hercogamia, sendo amplamente distribuída nas Angiospermas (Webb & Lloyd 1986). A hercogamia diminui a probabilidade de transferência de pólen dentro da mesma flor e, no caso de espécies com polimorfismo floral, entre flores com a mesma morfologia (Darwin 1877, Ganders 1979, Barrett 1992). Paralelamente aos aspectos morfológicos, algumas espécies apresentam flores com diferenças no comprimento do estilete (polimorfismo estilar), no qual, provavelmente, foi causado por mutações ligadas ao gene que controla a altura do verticilo feminino. O dimorfismo estilar, um exemplo de polimorfismo, é um desses sistemas sexuais, no qual as populações vegetais são compostas por dois morfos florais que diferem, significativamente, no comprimento dos estiletos, mas não apresentam diferença na posição das anteras (Ferrero 2014).

Há na natureza diversos tipos de polimorfismos estilares, sendo um deles a distília. Espécies distílicas apresentam populações com flores com duas morfologias que são caracterizadas pela antera de um morfo se encontrar na mesma altura do estigma do outro morfo (hercogamia recíproca) (Webb & Lloyd 1986), porém, diferentemente do dimorfismo estilar, a altura das anteras entre morfos não é a mesma. Enquanto que em espécies distílicas a diferença na altura das anteras acaba caracterizando a hercogamia recíproca, traço floral, evolutivamente, importante na manutenção e surgimento desse polimorfismo, pois promove a polinização

cruzada (Barrett 1992), outros traços funcionais, como diferença no tamanho da corola, diâmetro do pólen e papila estigmática, atuam para aumentar o sucesso feminino e masculino das plantas (Barrett 2002).

Alguns estudos com espécies da família Rubiaceae têm registrado a presença da distília típica em alguns gêneros, como em *Psychotria*, *Faramea* e *Palicourea*, enquanto que em outros trabalhos exibem variações ocorrendo em algumas espécies da família (Consolaro 2008, Maruyama *et al.* 2010, Consolaro *et al.* 2011, Rodrigues & Consolaro 2013). Darwin (1877) foi o primeiro a sugerir que essas características tinham um significado evolutivo para as espécies distílicas, de maneira que elas atuavam ativamente promovendo a polinização entre os morfos. A essência dessa teoria é que a morfologia floral das espécies distílicas aumenta a eficiência da transferência de pólen entre morfos e a confirmação dessa ideia requer que as taxas de polinização cruzada possam ser comparadas com as taxas de polinização de auto e intramorfo (Pailler *et al.* 2002). Além disso, os estudos que observaram variações nessas características típicas da distília, discutem que essas alterações podem ser decorrentes de um defeito na transferência de pólen, talvez, por causa da falta de hercogamia recíproca ou de problemas nos serviços de polinização. No entanto, esses trabalhos não apuraram, diretamente, a funcionalidade da distília, abrindo caminho para estudo que visem responder essa questão. No presente trabalho, pretende-se averiguar as características reprodutivas de uma espécie tipicamente distílica, pertencente a um gênero com espécies identificadas com esse tipo particular de polimorfismo floral e averiguar se os polinizadores atuam com eficiência na transferência de pólen entre morfos.

CAPÍTULO 1 - SISTEMA REPRODUTIVO DE *FARAMEA MULTIFLORA* A. RICH. IN DC. (RUBIACEAE): UMA ESPÉCIE DISTÍLICA COM SISTEMA DE POLINIZAÇÃO MISTO.

Resumo

Espécies distílicas possuem os dois tipos de hercogamia, porém em indivíduos separados, sendo denominados morfo longistilo e brevistilo e a ocorrência dos dois morfos caracteriza a Hercogamia Recíproca. Esse tipo de polimorfismo floral, geralmente, vem acompanhado por um sistema de autoincompatibilidade heteromórfico e as populações distílicas tendem a apresentar uma proporção igual dos morfos. O presente trabalho teve como objetivo estudar a biologia reprodutiva de *Faramea multiflora* (L.) A Rich., dando ênfase aos aspectos distílicos e ao sistema de polinização misto (diurno e noturno). O trabalho foi realizado no Parque Natural Municipal Santa Cruz no município de Catalão, sudoeste de Goiás, Brasil. Foram obtidas informações sobre a fenologia da população de 2014 a 2015, biologia floral, morfometria floral, hercogamia recíproca, isopleτία, sistema reprodutivo e visitantes florais diurnos e noturnos. A população apresentou floração em massa no período chuvoso, com ambos os morfos florescendo ao mesmo tempo. As flores dos dois morfos apresentaram antese diurna, mas permanecem longevas durante à noite atraindo polinizadores noturnos. Os dois morfos mostraram hercogamia recíproca apenas entre os verticilos sexuais inferiores e apenas a altura do estigma do morfo brevistilo não é influenciada pelo tamanho da corola. O morfo brevistilo é mais frequente na população estudada, que se mostrou anisoplética. Os dois morfos mostraram autocompatibilidade, sobretudo o morfo brevistilo. As flores de *F. multiflora* foram visitadas por dois grupos principais de polinizadores, borboletas durante o dia e mariposas à noite. Algumas características de *F. multiflora* parecem estar associadas a um sistema de polinização generalista, como o padrão de floração em massa e a longevidade floral que atrai polinizadores diurnos e noturnos. Além da perda da reciprocidade entre os verticilos superiores, a população de *F. multiflora* estudada, também apresentou relaxamento no sistema de auto-incompatibilidade, o que pode ter contribuído para o desvio observado na isopleτία. Tanto polinizadores diurnos quanto noturnos visitaram mais as flores do morfo brevistilo, porém, além da produção de flores, que foi maior para o morfo brevistilo, nenhuma outra característica parece explicar essa diferença na taxa de visitas.

Palavras-chaves: Heterostilia; Autocompatibilidade; Polinização generalista; Distília atípica.

Introdução

A hercogamia é uma característica que está relacionada com a disposição espacial dos órgãos sexuais nas flores, sendo definida como a distância entre o estigma e a antera (Webb & Lloyd 1986). Ela pode manifestar-se com o estigma localizado acima das anteras (hercogamia de aproximação) ou vice-versa (hercogamia inversa) (Ganders 1979). É uma estratégia amplamente distribuída nas Angiospermas (Webb & Lloyd 1986), pois a separação espacial dos referidos órgãos diminui as chances de autopolinização e evita problemas ligados à endogamia (Barrett & Shore 1987, Takebayashi *et al.* 2006). A distília, um tipo de polimorfismo floral, possui os dois tipos de hercogamia em uma única espécie, porém em indivíduos separados, sendo-os agora denominados morfo longistilo e brevistilo, respectivamente (Ganders 1979, Barrett *et al.* 2000). A ocorrência combinada dos dois morfos caracteriza um tipo especial de hercogamia, denominada Hercogamia Recíproca (Darwin 1877). A altura dos estames de um morfo se dispõe na mesma altura do estigma do morfo oposto, de modo que a partir da visita de polinizadores, as flores longistilas tendem a encaminhar pólen para estigmas das flores brevistilas, enquanto as flores brevistilas tendem a transferir pólen para estigmas do morfo longistilo (Darwin 1877, Barrett 2002). Esse tipo de polimorfismo floral, geralmente, vem acompanhado por um sistema de autoincompatibilidade heteromórfico, no qual evita a fecundação por grãos de pólen de indivíduos do mesmo morfo (Ganders 1979, Bawa & Beach 1983, Kohn & Barrett 1992). Juntamente ao polimorfismo floral e ao sistema de incompatibilidade, outros traços florais acessórios podem existir, como diferença entre morfos no comprimento do tubo da corola, tamanho dos grãos de pólen, arquitetura das papilas estigmáticas etc., (Anderson 1973).

Populações distílicas tendem a apresentar uma proporção igual dos morfos (razão de 1:1 dos indivíduos), o que é chamado de isopleτία, porém podem ser observadas proporções desiguais dos morfos, havendo assim, anisopleτία na população (Ganders 1979, Paillet & Thompson 1997). Como mencionado, a distília geralmente está acompanhada por um sistema de auto incompatibilidade que, na teoria, fornece as condições para a atuação de uma seleção negativa dependente da frequência, de modo que o morfo brevistilo se manifesta na forma heterozigota e o longistilo na forma homozigota recessiva, resultando no equilíbrio da frequência dos morfos na população (Heuch 1979, Barrett 1992). A proporção dos morfos pode ser influenciada pela fecundidade relativa individual dos morfos e ainda por efeitos estocásticos em populações pequenas (Brys *et al.* 2008a), nas quais o tamanho da população afetaria também o comportamento dos visitantes florais.

Em populações distílicas, os visitantes florais transportam os grãos de pólen de anteras de um morfo para estigmas do mesmo nível ocorrentes no outro morfo, resultando em uma polinização denominada legítima ou intermorfo, enquanto a autopolinização e a polinização entre indivíduos do mesmo morfo são descritas como ilegítimas ou intramorfo (Darwin 1877). Alguns autores acreditam que o arranjo recíproco das flores antecedeu, evolutivamente, o sistema de incompatibilidade (Lloyd & Webb 1992, Barrett 2002), pois o posicionamento recíproco dos órgãos sexuais aumentaria o fluxo de pólen entre morfos compatíveis por meio de um serviço de polinização eficiente (Lloyd & Webb 1992, Ferrero *et al.* 2011). Alguns estudos têm demonstrado de fato a eficiência dos polinizadores na transferência de pólen intermorfo em espécies com grande reciprocidade, pois a deposição do pólen em partes diferentes do corpo do polinizador ocorre de forma funcional, aumentando a possibilidade da polinização cruzada (Ree 1997, Massinga *et al.* 2005).

A distília está relacionada com a polinização cruzada e a deposição de pólen em partes diferentes do corpo do polinizador (Lloyd & Webb 1992), desta forma, o sucesso reprodutivo de espécies distílicas depende da eficiência dos serviços de polinização. Esse serviço de polinização, muitas vezes envolve síndromes claras de polinização, representadas por um conjunto de características que relacionam a planta a um determinado grupo de polinizador (Johnson & Steiner 2000). No entanto, algumas espécies de plantas têm apresentado interações menos especializadas (Johnson & Steiner 2000, Ollerton *et al.* 2009, Maruyama *et al.* 2010). Sistemas de polinização mistos podem ser mais efetivos do que aqueles que apresentam apenas um grupo de polinizador (Muchhala *et al.* 2009) e são comuns em flores que permanecem mais do que uma noite receptivas (Maruyama *et al.* 2010). A presença de grupos distintos de polinizadores que contribuem com o serviço de polinização pode explicar a ausência de anomalias nas características distílicas, como a anisopleτία, mesmo na ausência do sistema de incompatibilidade (Maruyama *et al.* 2010).

A heterostília parece ter evoluído mais do que vinte vezes nas Angiospermas e está concentrada em espécies que são polinizadas por insetos, grupo este que oferece um serviço de polinização, especialmente, preciso (Barrett 2002). A distília já foi registrada em todos os continentes, com exceção da Antártida, e parece também ter evoluído várias vezes nas Angiospermas (Weller 2009), sendo bem representada nas espécies da família Rubiaceae (Ganders 1979, Taylor 2008). É uma família cosmopolita e muito bem representada nas regiões tropicais (Delprete 2004). Tem, aproximadamente, 550 gêneros e 9.000 espécies, sendo que cerca de 22% desses gêneros e espécies ocorrem no Brasil (Souza & Lorenzi 2008). *Faramea* é

um gênero de Rubiaceae ocorrente no Brasil e no bioma Cerrado, com uma riqueza de *ca.* de 150 espécies com distribuição do México à Argentina (Delprete 2010). No Brasil, o gênero apresenta *ca.* 90 espécies com 12 registros no bioma Cerrado (Mendonça *et al.* 2008).

Faramea multiflora pertence a um gênero que, praticamente, não possui trabalhos a respeito de sua biologia reprodutiva e, muito menos, dos processos ecológicos envolvidos em um sistema de polinização com visitantes diurnos e noturnos. Até o presente momento, existe um trabalho com *F. cyanea* desenvolvido na região do Triângulo Mineiro e dois com *F. occidentalis* na ilha de Barro Colorado no Panamá (Travers *et al.* 1998, Travers 1999), porém nenhum abordou a biologia reprodutiva e os aspectos ecológicos entre os morfos distílicos. *F. multiflora* é uma espécie pouco conhecida, ocorrendo em um bioma com uma intensa pressão antrópica, de modo que seu sistema reprodutivo pode fornecer informações que contribuam para o entendimento dos processos ecológicos associados com a distília.

Objetivo Geral

Estudar a biologia reprodutiva de *Faramea multiflora* (L.) A Rich., dando ênfase aos aspectos distílicos e ao sistema de polinização misto (diurno e noturno).

Objetivos específicos

- i. Averiguar os eventos fenológicos da população;
- ii. Estudar a biologia floral dos dois morfos na população;
- iii. Verificar a razão dos morfos na população;
- iv. Estudar a morfometria floral dos órgãos sexuais;
- v. Identificar o sistema de incompatibilidade da população;
- vi. Observar e analisar o comportamento dos visitantes florais diurnos e noturnos;

Material e métodos

Área de coleta e espécie estudada

O estudo foi desenvolvido em uma população no Parque Natural Municipal Santa Cruz (47°55'O e 18°9'S, 880 metros de altitude) no período de maio de 2014 a fevereiro de 2015. O parque é um fragmento florestal localizado no município de Catalão, sudoeste de Goiás, Brasil,

circundado por bairros residenciais e pastagens. Possui, aproximadamente, 29 ha onde a fitofisionomia de Cerrado predominante é a Mata Mesofítica (Ferreira & Consolaro 2013).

Faramea multiflora pertence a um gênero neotropical com distribuição desde a América Central e Meridional até a Bolívia e o Brasil, sendo comum em Matas de Galeria e Florestas Úmidas de Encostas (Delprete 2010). É uma espécie arbustiva que na área de estudo os indivíduos, raramente, atingiram 1,50 m de altura. Coleta para identificação da espécie encontra-se no Herbário UFG – tombo 43242.

Fenologia

Para acompanhar o período de floração e frutificação da população foram selecionados, aleatoriamente, 40 indivíduos dos dois morfos. As observações foram feitas, mensalmente, durante o período compreendido entre maio de 2014 e março de 2015.

Dois métodos foram aplicados para descrever o comportamento fenológico da população. Primeiramente, o Índice de Atividade para constatar a presença ou a ausência da fenofase no indivíduo, no qual permite observar a sincronia fenológica dos indivíduos na população. Um pequeno indício da floração e/ou da frutificação foi considerada como presença, e o contrário como ausência (Bencke & Morellato 2002). Foi desenvolvido também o método de Fournier (1974), uma metodologia também conhecida como Índice de Intensidade, no qual permite acompanhar o nível fenológico da população. Para essa segunda metodologia, foram concebidas cinco categorias de intensidade: (Zero) representando a ausência da fenofase, (Um) a presença da fenofase com 1 a 25%, (Dois) de 26 a 50%, (Três) de 51 a 75% e (Quatro) que foi de 76 a 100%. Posteriormente, os dados foram analisados com base na equação de Fournier:

$$IF = \Sigma \text{ notas} \times 100/4 \times N$$

Esse cálculo é a somatória das notas de Fournier dos indivíduos dividido pelo máximo de Fournier que pode ser alcançado por todos os indivíduos (N) na amostra. Segundo Bencke & Morellato (2002), o uso das duas metodologias pode fornecer informações complementares e facilitar as análises e interpretações sobre a fenologia da espécie estudada.

Biologia floral

Os dados de biologia floral foram coletados em 20 flores de cada morfo distribuídas em 20 indivíduos de cada morfo. Os caracteres averiguados foram cor, longevidade floral, tipo e disposição da inflorescência, horário de antese, a presença de odores após a antese, receptividade estigmática e viabilidade polínica. A antese e a receptividade estigmática foram consideradas a

partir do momento da separação dos lobos da corola e dos lóbulos do estigma, respectivamente, e a longevidade floral a partir do período da abertura dos botões até o momento que as flores apresentaram coloração escura e aparência frágil.

A viabilidade dos grãos de pólen foi desenvolvida pela técnica de coloração do citoplasma com carmim acético 2% (Radford *et al.* 1974) em pelo menos 20 flores distribuídas em cinco indivíduos de cada morfo nos dois períodos amostrais (diurno e noturno). Os dados dos dois morfos e para os dois turnos foram comparados com um teste *t* de *Student*.

Produção de inflorescências, flores, frutos e sementes

Foram marcados 20 indivíduos de cada um dos morfos florais para contabilizar todas as inflorescências por indivíduo. Foram amostradas também o número de flores por inflorescência ($N=5$) para estimar o número de flores formadas em cada indivíduo. Com a estimativa de flores por indivíduo foi feito um teste *t* para analisar se os morfos florais diferem, estatisticamente, quanto a produção de inflorescências e flores. Da mesma forma, foi feita uma estimativa de frutos com base no número de frutos por inflorescência. Esse mesmo cálculo foi desenvolvido para cada morfo. Foi realizado também a contabilização de sementes por frutos, de modo que o número de sementes produzidas foram amostradas e a sua condição de viabilidade (tamanho, forma e consistente) e inviabilidade (tamanho, forma e inconsistente, sem presença de endosperma) foi averiguada (Valois-Cuesta 2008). Para o número de óvulos, flores dos dois morfos ($N=30$) foram levadas ao laboratório, de modo que foram realizados cortes no ovário para que a contagem fosse realizada.

Morfometria floral

Foram coletadas, aleatoriamente, e fixadas em álcool (70%) 60 flores por morfo de 10 indivíduos. A morfometria floral foi realizada por meio de fotos digitais e programa de mensuração de imagem (ImageJ), sendo retiradas as seguintes medidas: comprimento dos estames (base da corola até o meio da antera), comprimento do estilete (base da corola a base do estigma), comprimento dos lobos estigmáticos (base do estigma até seu ápice) e comprimento do tubo da corola. A altura do estigma foi calculada pela soma do comprimento do estilete e comprimento dos lobos estigmáticos/2. Esse cálculo foi aplicado para não superestimar a altura do estigma, uma vez que ele é bífido e, em condições naturais, se encontra aberto. As análises morfométricas foram realizadas a partir de uma ANOVA (Ayres *et al.* 2003) (Bioestat 5.3).

Ao longo de um transecto de ca. de 800m foram morfotipados todos os indivíduos para averiguar a isopleia. O teste de Qui-quadrado foi realizado para análise de proporção entre os morfos (Ayres *et al.* 2003) (Bioestat 5.3).

A hercogamia recíproca foi calculada usando dois índices. Primeiro, foi realizado o Índice de Reciprocidade de Richards & Koptur (1993), que é dado pela $(\text{altura da antera} - \text{altura do estigma recíproco}) / (\text{altura da antera} + \text{altura do estigma recíproco})$. Esse índice quantifica, separadamente, a reciprocidade média entre os órgãos sexuais superiores e inferiores, sendo que o índice utiliza o valor de 0,0 como faixa de perfeição, porém números entre 0,05 e -0,05 ainda são aceitáveis. Foi utilizado também o Índice de Sánchez *et al.* (2013), que se baseia na comparação da posição relativa do estigma de um morfo com altura das anteras de todas as outras flores do morfo oposto na população. Segundo esse índice, a reciprocidade perfeita ocorre quando os valores estão acima de 0,95, com um valor máximo de 1,0 (Sánchez *et al.* 2013). A descrição completa do índice e o software para o desenvolvimento da análise está disponível em <http://webs.uvigo.es/plantecology/software.es.html>.

Pelos estames das espécies de Rubiaceae serem epipétalos, foi verificado dentro de cada morfo a dependência ou não da altura dos verticilos florais em relação ao comprimento da corola. Essa dependência foi analisada por meio de uma regressão linear, onde as inclinações que diferiram, significativamente de zero, indicaram uma relação entre o respectivo órgão e o comprimento da corola. A análise estatística foi realizada através do programa R (R Development Core Team 2009) usando o pacote Vegan (Oksanen *et al.* 2013).

Sistema de incompatibilidade

Para definir o sistema reprodutivo e determinar a expressão da incompatibilidade, foram feitas polinizações manuais em 11 indivíduos de cada morfo com, no mínimo, 28 tratamentos por tipo de polinização. Foram feitos os seguintes testes: a) agamospermia (as flores foram emasculadas e ensacadas para evitar a polinização natural); b) autopolinização manual (flores previamente escolhidas em pré-antese foram autopolinizadas); c) autopolinização espontânea (flores foram ensacadas para se evitar a polinização); d) polinização cruzada legítima (flores anteriormente ensacadas foram polinizadas com pólen do morfo oposto); e) polinização cruzada ilegítima (flores selecionadas foram ensacadas e polinizadas com pólen do mesmo morfo de indivíduos diferentes); f) controle (flores foram marcadas e deixadas livres para a polinização natural); g) limitação (flores foram polinizadas com pólen do morfo oposto e deixadas livres para a polinização natural). Os resultados de frutificação foram analisados pelo Índice de

Autoincompatibilidade (IAI), dado pela razão do tratamento de autopolinização sobre tratamento de polinização intermorfo (Bullock 1985). Segundo esse índice, valores maiores ou iguais a 0,25 indicam que a população apresenta um desvio para autocompatibilidade. Para averiguar a eficiência dos polinizadores na frutificação, foi utilizado o Índice de Eficiência Reprodutiva (IER), dado pela razão entre a produção de frutos do tratamento controle e da polinização cruzada intermorfo (Zapata & Arroyo 1978). Valores próximo a 1 indicam maior eficiência reprodutiva dos polinizadores.

Para observar o crescimento dos tubos polínicos, os pistilos foram coletados e fixados em FAA 50% e após 24 horas os mesmos foram alocados em um frasco com álcool 70% para posterior análise em laboratório (Martin 1959). As flores foram coletadas em dois intervalos pré-determinados de acordo com a longevidade floral da espécie, sendo eles, 9 horas e 12 horas após a polinização. Os tratamentos realizados foram: polinização cruzada intermorfo, polinização cruzada intramorfo e autopolinização manual. Os tratamentos de polinização foram executados por morfo, sendo 10 flores para cada intervalo de coleta distribuídas em 10 indivíduos.

Visitantes florais

Os visitantes florais de *F. multiflora* foram observados no período diurno e noturno durante 48 horas, sendo 34 horas para o diurno e 14 horas para o noturno. Os intervalos foram das 08:00 às 15:00h e das 16:00 às 22:00h. Foi observado o comportamento dos visitantes, tais como polinizador (quando contatava o corpo com os verticilos reprodutivos) e pilhador (quando coletava o recurso sem contatar os verticilos reprodutivos), número de visitas por hora, o número de visitas por dia e o número de flores visitadas por planta por visita (Valois-Cuesta 2008). Durante as visitas, os polinizadores foram coletados e fotografados. Para comparar a frequência das visitas entre os morfos, se cada tipo específico de polinizador apresenta preferência por um deles e se existe diferença na frequência de visitas entre os visitantes dos dois turnos, foi utilizado o teste de Poisson (Bioestat 5.3).

Resultados

Fenologia

Os picos de intensidade e de atividade coincidiram para as fenofases de floração e frutificação. A população estudada floresceu do final de dezembro a meados de janeiro com pico de floração na primeira semana do mês de janeiro, florescendo no período chuvoso. No começo das observações, mês de maio, foi observada uma floração após a estação chuvosa e início da

estação seca em 2014, floração que se mostrou rápida, com poucos indivíduos florescendo e esses com poucas flores. A frutificação ocorreu entre maio de 2014 e janeiro de 2015 com pico no mês de agosto, período marcado pela escassez de chuvas (Figura 1).

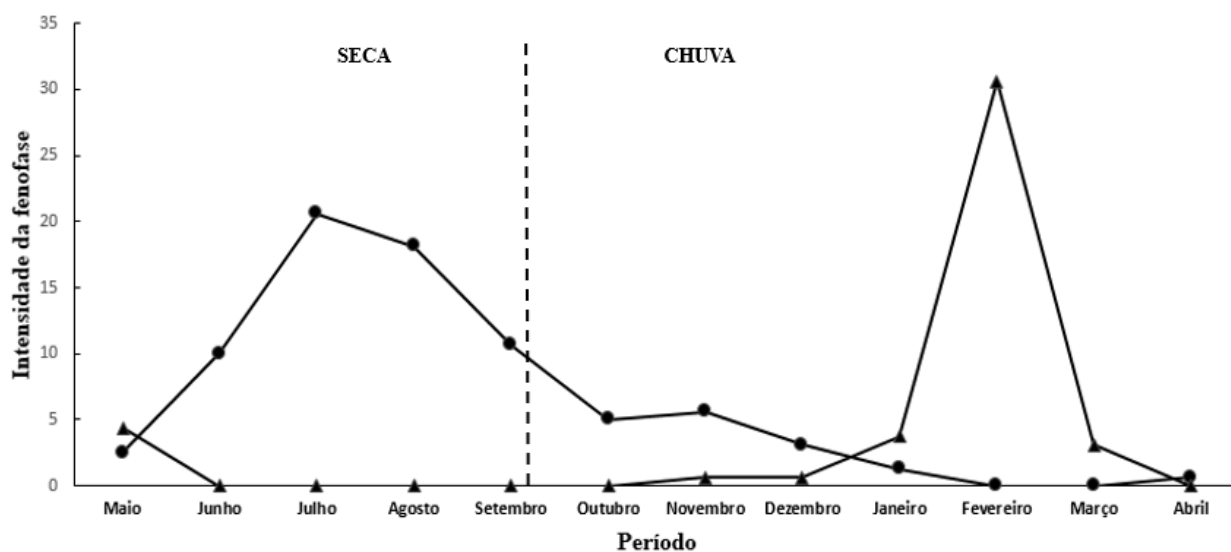


Figura 1. Fenologia da floração e frutificação de *Faramaea multiflora* no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. ▲—Floração; ●—Frutificação.

Biologia Floral

A abertura das flores começou por volta das 07:00h, marcada pelo desprendimento dos lobos da corola e, aproximadamente, às 09:00h as flores se encontravam completamente abertas. As flores tiveram uma duração de 24 horas, apresentando coloração mais clara e as pétalas murchas ao final da longevidade. Foi observado que 48 horas após o início da antese todas as flores já tinham se desprendido. As inflorescências são terminais, paniculadas, pedunculadas, com raque levemente azulada. Nos primeiros dias da floração foi observado a abertura de poucas flores por inflorescência, seguido por um número maior de flores abertas nos dias subsequentes. Logo após a abertura, foi observado um odor adocicado bastante acentuado, sendo contínuo durante o dia e à noite. O estigma estava receptivo logo após a abertura da flor, permanecendo nessa condição ao longo do dia, quando a receptividade foi observada até as 19:00h.

O morfo brevistilo apresentou um percentual de viabilidade polínica média de $93,4 \pm 5,15$ em média, enquanto que no morfo longistilo foi observada uma viabilidade média de $91 \pm 5,33$. A análise estatística demonstrou que essa diferença não foi significativa ($t=1,41$ $p=0,08$). O morfo brevistilo não mostrou diferença significativa na viabilidade dos grãos de pólen entre os períodos diurno e noturno ($t = -0,70$ $p = 0,24$), assim como o morfo longistilo ($t=-1,11$ $p=0,13$). Os dois morfos não apresentaram diferença significativa entre eles nos dois períodos observados (Dia - $t=1,08$ $p=0,14$ e Noite $t=0,90$ $p=0,18$).

A morfotipagem dos indivíduos mostrou que a população estudada é anisoplética, apresentando proporção desigual dos morfos ($\chi^2=64,07$, $p<0,0001$). Num total de 210 indivíduos amostrados, 163 apresentaram flores brevistilas e apenas 47 tinham flores longistilas, uma proporção próxima de 3,5 indivíduos brevistilos para cada indivíduo longistilo.

Produção de inflorescências, flores, frutos e sementes

Os valores detalhados da produção de flores e inflorescências por morfo estão representados na Tabela 1. Foi encontrada diferença na produção de inflorescências entre os morfos, com o morfo brevistilo formando mais inflorescências do que o morfo longistilo. O número de flores por inflorescência também foi, estatisticamente, diferente e novamente o morfo brevistilo apresentou um número maior do que o morfo oposto. O número estimado de flores por indivíduo também foi diferente com o morfo brevistilo produzindo mais flores em comparação com o morfo longistilo. A contabilização de frutos mostrou que o morfo brevistilo produz mais frutos por inflorescência e tem um número estimado de frutos por indivíduo maior que o morfo longistilo.

Tabela 1. Resultados de produção de flores e inflorescências para os dois morfos de *Faramea multiflora* no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. Letras diferentes simbolizam diferenças significativas entre os morfos ($p<0,05$). Valores: Média \pm Desvio Padrão (N).

Produção	Morfo		t
	Brevistilo	Longistilo	
Nº inflorescências	39,77 \pm 20,20(18) a	27,50 \pm 19,43(16) b	1,97
Nº flores por inflorescência	20,96 \pm 6,89(90) a	17,50 \pm 4,98(80) b	2,72
Nº flores por indivíduo*	880,7 \pm 561,22(18) a	531,71 \pm 430,12(16) b	2,18
Nº frutos por inflorescência	10,15 \pm 5,03(90) a	5,36 \pm 4,42(80) b	6,24
Nº frutos por indivíduos*	446,21 \pm 453,67(18) a	197,63 \pm 268,68 b	2,49

*Valor estimado.

As flores de *F. multiflora* produziram, no total, a mesma quantidade de óvulos (51 óvulos em 30 flores amostradas para os dois morfos), sendo encontrado nas flores de um a dois óvulos. O número de sementes viáveis formadas por morfo não foi, estatisticamente, diferente (30 frutos brevistilos com 49 sementes e 30 longistilos com 48 sementes; $p=0,41$, $Z= 0,2218$). Quando se analisa a porcentagem das sementes formadas em relação ao número de óvulos produzidos, o

morfo brevistilo obteve um sucesso 96,07% na formação de sementes e o morfo longistilo 94,11%.

Morfometria floral

Os dados de morfometria floral estão representados na Tabela 2. Não foi encontrada diferença significativa entre os morfos apenas no comprimento do tubo da corola. A morfometria mostrou que a altura das anteras dos dois morfos apresentou diferença significativa, sendo as anteras do morfo brevistilo maiores que a do longistilo. O mesmo foi encontrado no diâmetro do grão de pólen. Os valores para o comprimento do estilete também foram, significativamente, distintos, com o morfo longistilo apresentando tamanho superior (ver Tabela 2).

O cálculo do Índice de Reciprocidade de Richards & Koptur (1993) apresentou um valor de $0,07 \pm 0,05$ para os órgãos inferiores e $0,82 \pm 0,16$ para os superiores, sendo considerada recíproco e não recíproco, respectivamente. A população estudada obteve o valor de 0,11 para o índice de reciprocidade Sánchez *et al.*, (2013), representando uma baixa reciprocidade na população.

Tabela 2. Dados morfométricos de flores brevistilas e longistilas de *Faramea multiflora* no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. As medidas estão em milímetros, mas em micrometros para os grãos de pólen. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) usando o teste estatístico (ANOVA). $N = 59$ para as medidas das peças florais e $N = 1200$ para o diâmetro polínico.

Característica morfométrica	Média ± Desvio padrão	
	Brevistilo	Longistilo
Comprimento do tubo da corola	7,84 ± 0,56 a	7,73 ± 0,51 a
Altura dos estames	7,60 ± 0,56 a	5,57 ± 0,44 b
Comprimento das anteras	3,70 ± 0,23 a	3,44 ± 0,27 b
Comprimento dos lobos estigmáticos	1,46 ± 0,21 a	1,99 ± 0,28 b
Altura do pistilo	3,99 ± 0,29 a	10,72 ± 0,65 b
Diâmetro polínico	5,99 ± 0,78 a	4,81 ± 0,84 b

As análises de regressão mostraram que apenas a altura do estigma do morfo brevistilo não é influenciada pelo tamanho da corola (Tabela 3). A relação entre os órgãos reprodutivos dos dois morfos de *F. multiflora* e o tamanho da corola está representada na Figura 2.

Tabela 3. Análise de regressão da relação entre comprimento médio da corola com a altura média dos verticilos reprodutivos dentro de cada morfo de *Faramea multiflora* no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. $p < 0,05$ indica relação de influência da corola sobre os órgãos florais.

Morfo	Órgão Floral	R ²	F	p
Brevistilo	Antera	0,8322	288,6	< 0,05
	Estigma	0,0444	3,698	0,06
Longistilo	Antera	0,3935	38,63	< 0,05
	Estigma	0,3442	31,45	< 0,05

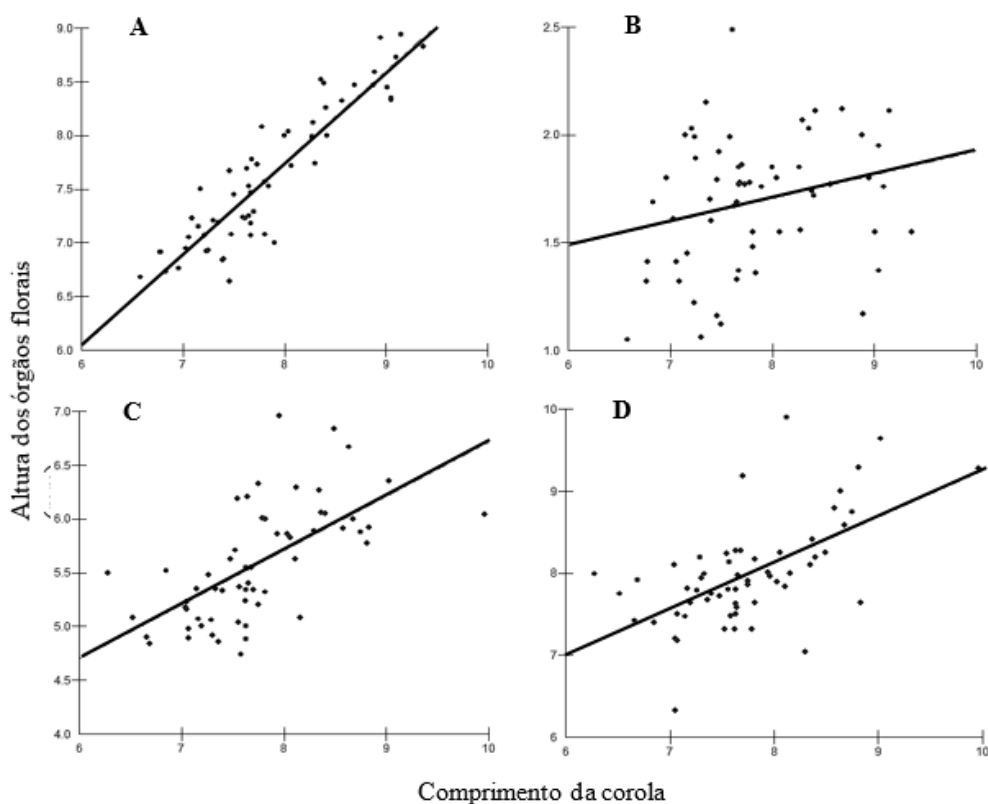


Figura 2. Relação do comprimento da corola com a altura dos órgãos reprodutivos de *Faramea multiflora* no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. **A:** comprimento da corola brevistila com a altura da antera do mesmo morfo. **B:** comprimento da corola com a altura do estigma, ambos brevistilos. **C e D:** comprimento da corola longistila com a altura da antera e do estigma longistilo, respectivamente.

Sistema de incompatibilidade

Os resultados de frutificação indicaram que a população em estudo apresenta um desvio no sistema de incompatibilidade. O Índice de Autoincompatibilidade para o morfo brevistilo foi de 0,69, enquanto que para o morfo longistilo foi de 0,39. Segundo Bullock (1985), esse valor indica um desvio na auto incompatibilidade, sobretudo no morfo brevistilo. O Índice de

Eficiência Reprodutiva teve valor de 0,75 no morfo brevistilo e 0,51 no longistilo, demonstrando uma maior eficiência dos polinizadores na frutificação do brevistilo em comparação com o morfo longistilo. Os valores para todos os tratamentos realizados com a população de *F. multiflora* estão amostrados na Tabela 4.

Análise estatística mostrou diferença significativa na frutificação entre o tratamento de autopolinização espontânea e os demais tratamentos para o morfo brevistilo. Ainda para o morfo brevistilo, a polinização cruzada intermorfo formou mais frutos em relação ao tratamento de limitação, o controle e a autopolinização espontânea ($Z=3,59$ $p=0,005$; $Z=2,91$ $p=0,04$; $Z=3,19$ $p=0,02$). Para o morfo longistilo, a autopolinização espontânea apresentou uma taxa de frutificação, estatisticamente, maior do que o tratamento de polinização cruzada intermorfo ($Z=-3,35$ $p<0,05$). Já o tratamento de polinização cruzada intermorfo mostrou diferença significativa em relação a todos os outros tratamentos, com frutificação maior na polinização intermorfo em todos os casos.

Tabela 4. Resultado dos testes de polinização controlada em *Fareamea multiflora*, no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. Letras maiúsculas e minúsculas representam diferença entre os morfos, enquanto letras diferentes sinalizam diferença entre tratamentos no mesmo morfo ($p<0,05$).

Tratamento	N. Flores		N. Frutos		Frutificação (%)	
	Brevi	Longi	Brevi	Longi	Brevi	Longi
Agamospermia	28	28	0	0	0,00*	0,00*
Autopolinização manual	32	30	15	9	46,87a	30,00 a
Autopolinização espontânea	31	29	8	9	25,80bc	31,03 ac
Polinização natural (Controle)	41	38	21	15	51,21ade	39,47 ace
Polinização intermorfo	31	30	21	23	67,74adfg	76,66 bdfg
Polinização intramorfo	29	31	11	10	37,93adegi	32,25 acehi
Limitação de pólen	33	33	21	16	63,63bdehi	48,48 bcehi

*Sem frutos formados na Agamospermia.

As observações do crescimento do tubo polínico de *F. multiflora* mostraram que, em todos os três tipos de polinização (polinização intermorfo, intramorfo e autopolinização manual), ocorreram a germinação dos grãos de pólen até o ovário. Da mesma forma, foi observado a interrupção do tubo polínico nos dois morfos, ocorrendo nos três tipos de polinização feitos. Os

valores para todos os tratamentos realizados com a população de *F. multiflora* estão amostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados das observações de crescimento do tubo polínico em *Faramea multiflora*, no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. N igual para os dois morfos.

Tratamento	N	Resultados					
		Brevistilo			Longistilo		
		A.O	I.E	S.G	A.O	I.E	S.G
Autopolinização	20	10	6	4	7	9	4
Cruzado Intermorfo	20	10	0	10	11	5	4
Cruzado Intramorfo	20	8	6	6	14	1	5

A.O: Alcançaram o ovário; I.E: Interrompidos no estigma; S.G: Pistilo sem grãos de pólen.

Não foi observado nenhum padrão de interrupção do tubo polínico em nenhum dos tratamentos e em nenhum dos morfos. Esses resultados observados tanto para o morfo brevistilo quanto para o morfo longistilo estão representados na Figura 3.

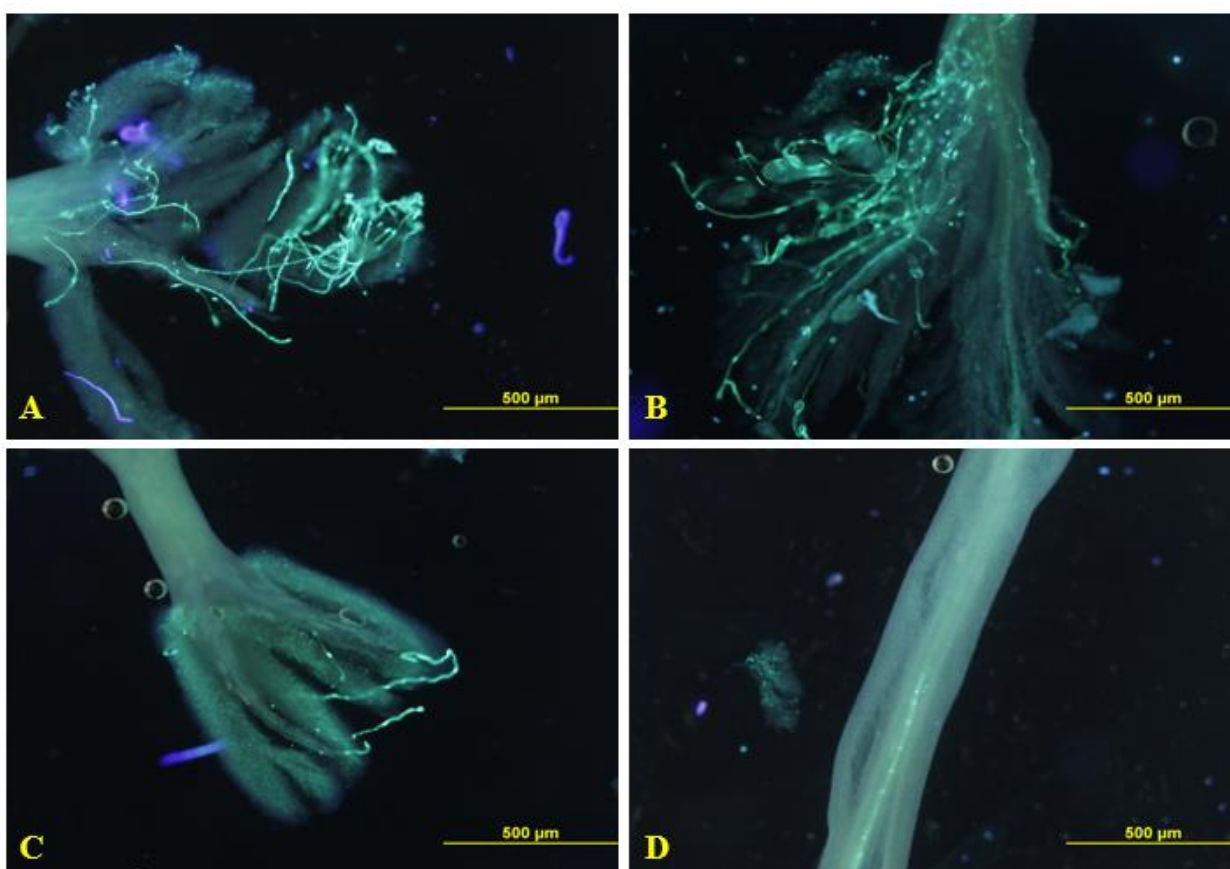


Figura 3. Crescimento dos tubos polínicos de *Faramea multiflora* no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. **A:** Pistilo longistilo após polinização intermorfo, com tubos crescendo. **B:** Pistilo brevistilo após autopolinização. **C:** Pistilo longistilo após polinização intramorfo. **D:** Pistilo brevistilo após polinização intermorfo.

Visitantes Florais

Foram observadas 91 visitas em 34 horas de observações durante o dia, representando uma taxa de visitação de, aproximadamente, 2,7 visitas por hora – v/h, enquanto no período noturno foram registradas 75 visitas em 14 horas de observação, uma taxa aproximada de 5,4 v/h. Essa diferença na taxa de visitas não foi estatisticamente significativa ($t= 0,15$ $p=0,88$). Foi observado diferença no número de visitas entre os morfos, com o morfo brevistilo (123) apresentando um número maior de visitas em comparação com o morfo longistilo (43) ($\chi^2= 38,55$ $p<0.0001$) na somatória dos dois turnos. Durante o dia, o morfo brevistilo também apresentou um número significativamente maior de visitas ($\chi^2= 4,95$ $p<0.05$), mesmo resultado observado à noite ($\chi^2= 45,20$ $p<0.0001$). As visitas foram concentradas no final da tarde e início da noite. Todos os visitantes observados pertencem a classe Insecta e a maioria dos visitantes florais pertenceram a ordem Lepidóptera (94%), com 6% restantes da ordem Himenóptera. Durante o dia, os principais visitantes observados nas flores de *F. multiflora* foi um grupo de borboletas, responsável por, aproximadamente, 87% das visitas totais ($2,32 \pm 1,05$ v/h). No período noturno, pequenas mariposas foram os únicos visitantes ($5,28 \pm 6,83$ v/h). Os dois principais polinizadores, borboletas e mariposas, apresentaram comportamento semelhante ao visitarem as flores de *F. multiflora*: foi observado que elas inserem a probóscide no tubo da corola, no entanto, elas não tocam nenhuma outra parte do corpo nas anteras e/ou estigmas dos dois morfos. Entretanto, as borboletas apresentam um tempo de visita em cada flor de, aproximadamente, 4 segundos, enquanto que as mariposas foram mais rápidas, permanecendo na flor por no máximo, dois segundos. Apenas duas espécies de Hymenoptera foram observadas coletando pólen, sendo que todos os outros visitantes buscaram como recurso o néctar. Não foi observado insetos pilhadores e/ou herbívoros.

Os principais polinizadores, representados pela ordem Lepidoptera, visitaram com maior frequência o morfo brevistilo. Ambos os grupos de polinizadores diurnos e noturnos visitaram mais flores do morfo brevistilo em comparação com o morfo longistilo. Os visitantes da ordem Hymenoptera podem ser considerados como visitantes ocasionais de *F. multiflora* na área estudada (Tabela 6).

Tabela 6. Número total de visitas e frequência dos visitantes florais de *Faramea multiflora* (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, GO. O valor de Z corresponde ao teste de Poisson, no qual compara número de visitas de cada espécie entre os morfos florais ($p < 0,05$).

Ordem/Família	Nº total de visitas	Frequência relativa (%)	Morfotipo floral		Z	p
			Brevi	Longi		
HYMENOPTERA						
Apidae spp	8	4,81	7	1	2,182	<0,05
Vespidae sp	2	1,2	0	2	1,313	0,10
LEPIDOPTERA						
Lepidoptera spp*	81	48,79	50	31	2,115	<0,05
Lepidoptera spp**	75	45,18	68	7	7,853	<0,001

* Espécies diurnas

** Espécies noturnas

Discussão

A população de *Faramea multiflora* estudada apresentou uma floração em um período de tempo relativamente curto, com praticamente, todos os indivíduos florescendo num intervalo de duas semanas, coincidindo com o início do período chuvoso e de temperaturas elevadas, padrão observado em outras espécies (Freitas & Oliveira 2002, Consolaro *et al.* 2011, Sá 2013). Alguns estudos discutem que a ocorrência de floração no período chuvoso, no estrato herbáceo-arbustivo de matas secas semidecíduais, deve estar relacionado ao fato da maior atividade dos polinizadores neste período. (Oliveira & Gibbs 2002, Ribeiro & Walter 2008). Outro período de floração foi observado no final da estação chuvosa, no entanto, foi ainda mais rápido, com poucos indivíduos florescendo e esses apresentando um número reduzido de flores e inflorescências. Esse padrão de floração em massa pode estar associado com a atração de vários grupos de polinizadores (Gentry 1974), tendo sido registrado em outras espécies com grupos de polinizadores mais generalistas (Johnson & Steiner 2000). *F. multiflora* apresentou dois grupos de polinizadores atuando em horários distintos, representando uma polinização mais generalista, observada também em outras espécies do gênero (Travers 1999, Maruyama *et al.* 2010).

As flores de *F. multiflora* são azuis, tubulares, com odor adocicado e antese diurna, características comuns em espécies polinizadas por borboletas (Rech *et al.* 2014), contudo as flores de *F. multiflora* permanecem longevas durante a noite, exalando odor forte e adocicado também neste período, o que atrai polinizadores noturnos (Maruyama *et al.* 2010). O mecanismo evolutivo relacionado a síndromes de polinização seleciona caracteres que atraem o polinizador

mais efetivo, levando a co-adaptação e a uma relação mais especializada entre planta-polinizador (Aigner 2004). *F. multiflora* parece seguir caminho oposto, com a observação de uma polinização mista, com grupos distintos atuando em horários diferentes, comportamento observado também em *F. cyanea* (Maruyama *et al.* 2010). Algumas mudanças na morfologia e/ou na biologia floral podem estar relacionadas com o estabelecimento de sistemas mais generalistas em algumas espécies, nas quais, pode-se observar uma redução na importância do polinizador especialista (Brito *et al.* 2016). No entanto, em *F. multiflora* a permanência das flores abertas durante a noite e ainda exalando odor nesse período parece ser o fator crucial para o estabelecimento um sistema de polinização mais generalista. Armbruster & Baldwin (1998) explicam que algumas espécies podem ter sucesso com sistemas mais generalistas, em populações que se encontram em localidades com ausência de seu polinizador específico, o que pode ocorrer com a população estudada. Estudos de comunidade mostram que existe um predomínio de relações mais generalistas, como a observada aqui em *F. multiflora*, e que essa estratégia se mostra mais estável (Waser *et al.* 1996, Gómez 2002).

Essa estratégia de polinização mista parece ser comum para o gênero *Faramea* (Travers 1999, Maruyama *et al.* 2010) e pode estar presente em outras espécies da família Rubiaceae. Em *F. occidentalis* foi observado a visitação por grupos distintos, com abelhas como principais visitantes durante o dia e mariposas à noite (Bawa *et al.* 1985, Travers 1999). Em um estudo feito no Cerrado, *F. cyanea* também apresentou um sistema misto, com algumas espécies de mariposas como principais polinizadores à noite e abelhas com maior frequência durante o dia (Maruyama *et al.* 2010). Assim como esses exemplos, *F. multiflora* demonstrou a presença de grupos distintos no presente estudo, no entanto, durante o dia o principal polinizador foram borboletas. Esse comportamento mais generalista também é observado em espécies de outros gêneros, como visto em *Amaioua guianensis* Aubl. (Amorim & Oliveira 2006) e em outras famílias (Brito *et al.* 2016, Aguilar-Rodríguez *et al.* 2016), que, assim como, *F. cyanea* apresenta abertura das flores ao entardecer, característica comum de espécies visitadas por polinizadores noturnos (Rech *et al.* 2014). Já, *F. multiflora* apresenta abertura floral ao amanhecer, porém, suas flores permanecem abertas e exalando odor durante a noite, atraindo polinizadores noturnos.

A população estudada de *F. multiflora* apresentou praticamente mais do que três indivíduos do morfo brevistilo para cada indivíduo do morfo longistilo, um desvio estatisticamente significativo da isopleia. Alguns estudos consideram que esse desvio na isopleia pode ser causado por um relaxamento no sistema de incompatibilidade, observado neste estudo para os dois morfos, sobretudo no morfo brevistilo (Sakai & Wright 2008, Consolaro *et*

al. 2011, Zhou *et al.* 2012) ou ainda, por perturbações ambientais que podem prejudicar a disponibilidade de polinizadores (Matsumura & Washitani 2000, Endels *et al.* 2002). Estudo feito com algumas espécies de *Psychotria* no Panamá mostrou que uma limitação na polinização cruzada pode estar relacionada com a quebra em características da heterostilia, como a isoplelia, sobretudo se um dos morfos apresentar autocompatibilidade (Sakai & Wright 2008). O sistema de auto-incompatibilidade parece mesmo estar relacionado com a manutenção da isoplelia em espécies distílicas, como observado em alguns estudos (Castro *et al.* 2004, Coelho & Barbosa 2004, Teixeira & Machado 2004, Furtado 2015). Isso parece se confirmar em *F. multiflora*, já que a ausência de um sistema de incompatibilidade está acompanhado de um desequilíbrio na proporção dos morfos na população aqui estudada.

Além da perda do sistema de incompatibilidade, a população de *F. multiflora* aqui estudada, também apresentou um desvio na hercogamia recíproca, com hercogamia exata observada entre os verticilos inferiores, mesmo padrão observado em *Psychotria barbiflora* DC (Teixeira & Machado 2004), *P. nuda* (Castro & Araújo 2004), *F. cyanea* (Maruyama *et al.* 2010). A hercogamia recíproca é descrita como uma característica essencial para os modelos que explicam a evolução e manutenção da distilia, já que é tida como responsável por promover a polinização cruzada por meio da deposição de grãos de pólen em partes distintas do corpo dos polinizadores (Charlesworth & Charlesworth 1979, Lloyd & Webb 1992). Em *F. cyanea*, a falta da hercogamia exata entre os morfos parece não ter afetado o fluxo de pólen, porém o estudo não examinou a transferência de pólen entre os morfos por meio dos polinizadores (Maruyama *et al.* 2010). Em *P. nitidula*, a falta de hercogamia recíproca contribuiu para um desequilíbrio no fluxo de pólen, mas o sistema de auto-incompatibilidade parece ter mantido a isoplelia na população (Furtado 2015). Além da perda da reciprocidade entre os verticilos superiores, a população de *F. multiflora* estudada, também apresentou relaxamento no sistema de auto-incompatibilidade, o que pode ter contribuído para o desvio observado na isoplelia.

O relaxamento do sistema de incompatibilidade pode levar a predominância de indivíduos longistilos, já que são homozigotos recessivos (Ganders 1975). Em alguns estudos foi observado até mesmo o monomorfismo, sempre acompanhados da perda no sistema de incompatibilidade (Sobrevila *et al.* 1983, Sakai & Wright 2008, Consolaro *et al.* 2011, Rodrigues & Consolaro 2013). Contudo, nos resultados encontrados em *F. multiflora*, o morfo brevistilo, além de estar presente em maior número, também apresentou uma produção maior de inflorescências, de flores e frutos. O relaxamento no sistema de incompatibilidade se mostrou maior para o morfo brevistilo, no entanto, as taxas de frutificação não foram diferentes entre os

morfos, o que, posteriormente, seria esperado uma diferença seletiva no processo de germinação das sementes entre morfos. O crescimento do tubo polínico também não revelou diferenças entre os morfos, no entanto, não foi observado a velocidade de crescimento dos tubos. Em *Hedyotis acutangula* Champ (Rubiaceae), a velocidade do crescimento dos tubos foram diferentes entre os morfos, com o morfo longistilo apresentando uma diferença no crescimento entre polinizações legítimas e ilegítimas maior do que o morfo brevistilo, representando uma autoincompatibilidade ‘oculta’ (Wu *et al.* 2010). Em *F. multiflora*, a diferença foi observada na produção de frutos entre os tratamentos dentro de cada morfo, com os dois morfos sendo capazes de produzir frutos após polinizações ilegítimas e até mesmo autopolinizações.

Os desvios reprodutivos encontrados no morfo brevistilo na população estudada pode ter substancial atuação dos polinizadores, principalmente pela maior reciprocidade do morfo em questão (Johnson & Steiner 2000). Segundo Coelho & Barbosa (2004), as borboletas podem promover um fluxo assimétrico ao tocar a cabeça nas anteras do morfo brevistilo, apesar de que em *F. multiflora* as borboletas e as mariposas noturnas parecem não tocar as anteras do morfo brevistilo com a cabeça ao inserirem a probóscide dentro da flor. Polinizadores com comportamentos distintos podem atuar de forma complementar em horários diferentes em espécies com polinização noturna e diurna, contribuindo efetivamente para o sucesso reprodutivo (Wolff *et al.* 2003, Maruyama *et al.* 2010). Tanto os polinizadores diurnos, representados principalmente por borboletas, quanto as mariposas noturnas visitaram mais flores de indivíduos brevistilos. No entanto, a única diferença, na apresentação floral dos morfos, observada neste estudo, foi a produção de flores, com o morfo brevistilo produzindo mais flores por inflorescência e mais inflorescências por indivíduo. Não foi possível mensurar a quantidade de néctar produzido, e portanto, não há observação de que um dos morfos produza mais néctar como recompensa para os visitantes. Por isso, há a necessidade de mais estudos na área com esta população de *F. multiflora* a fim de entender o porquê da preferência do morfo brevistilo pelos polinizadores.

CAPÍTULO 2 - FLUXO DE PÓLEN NA DISTÍLICA *FARAMEA MULTIFLORA* A. RICH. (RUBIACEAE)

Resumo

O arranjo das estruturas reprodutivas em espécies heterostílicas favorece a polinização cruzada por meio da deposição de pólen em partes distintas do corpo do polinizador. Em plantas hermafroditas, o fluxo de pólen pode ser diferente entre os indivíduos e isso pode fazer com que alguns indivíduos atuem mais como doadores de pólen ou como receptores. O presente trabalho teve como objetivo verificar o fluxo de pólen entre os morfos distílicos em uma população de *Faramea multiflora* A. Rich.. O estudo foi desenvolvido em uma população no Parque Natural Municipal Santa Cruz nos meses de Janeiro e Fevereiro de 2015. Foram obtidas informações a respeito da morfometria floral de ambos os morfos, dimorfismo polínico, produção de pólen e transferência de pólen entre os morfos. A população estudada mostrou falha na hercogamia recíproca, sendo observada reciprocidade apenas entre os verticilos inferiores. Foi observado dimorfismo no tamanho dos grãos de pólen, com o morfo brevistilo apresentando grãos maiores, no entanto, não houve diferença na produção de pólen entre os morfos. Os estigmas do morfo brevistilo receberam mais grãos de pólen e quando analisado a qualidade do grão, o morfo brevistilo também recebeu mais grãos legítimos enquanto que para grãos ilegítimos houve diferença apenas quando se analisa os tratamentos separados, novamente com o morfo brevistilo recebendo mais grãos. O morfo longistilo mostrou uma função masculina maior, enquanto o morfo brevistilo apresentou uma função feminina maior. Uma população distílica sem hercogamia recíproca e, provavelmente com desvios no fluxo de pólen, pode se manter isoplética quando o sistema de incompatibilidade é atuante, discussão essa que é confirmada com a população estudada de *F. multiflora*, uma vez que o morfo brevistilo se mostrou autocompatível e 3,5 mais frequente do que o longistilo. Mesmo com o dimorfismo polínico, a produção de pólen foi a mesma para os dois morfos, o que pode ser explicado por fatores relacionados a nutrientes do solo, mas não analisados no presente estudo. Devemos ressaltar que a população estudada apresentou hercogamia recíproca apenas entre os verticilos baixos, o que explica o porquê do morfo brevistilo receber mais grãos legítimos, já que seu estigma é recíproco às anteras do morfo longistilo. O que pode estar havendo na população estudada é um desvio na aptidão reprodutiva dos morfos, o que pode levar até a perda total do morfo auto-incompatível, no caso o longistilo, e a população se tornar monomórfica brevistila.

Palavras-chaves: Aptidão reprodutiva; Dimorfismo polínico; Transferência assimétrica.

Introdução

A heterostilia é definida como a presença de dois (distilia) ou três (tristilia) morfos florais em determinada espécie com os respectivos morfos exibindo uma hercogamia recíproca entre os órgãos reprodutivos opostos (Barrett 1992). Junto com a hercogamia recíproca, outras características estruturais e fisiológicas estão frequentemente associadas a heterostilia, como por exemplo, o sistema heteromórfico de auto-incompatibilidade. Os modelos que visam explicar a evolução da distilia diferem no que diz respeito se o sistema de incompatibilidade heteromórfico é uma condição anterior ou posterior a hercogamia recíproca. No modelo de Charlesworth & Charlesworth (1979), o sistema de incompatibilidade é predito anterior ao estabelecimento da hercogamia recíproca e é considerado como um pré-requisito para a evolução dos polimorfismos florais. Ao contrário, o modelo proposto por Lloyd & Webb (1992) diz que a hercogamia recíproca evoluiu primeiro, e que o sistema de incompatibilidade heteromórfico pode ter se desenvolvido posteriormente. Ainda não há evidências suficientes para se refutar ou aceitar completamente uma dessas ideias como regra geral para a evolução dos polimorfismos florais, no entanto, inúmeros trabalhos demonstram origens independentes da heterostilia em inúmeras famílias, possibilitando que ambos os caminhos possam ter ocorrido (Zhou *et al.* 2015).

Darwin (1877) propôs que o arranjo das estruturas reprodutivas em espécies heterostílicas favorece a polinização cruzada por meio da deposição de pólen em partes distintas do corpo do polinizador. A deposição de pólen legítimo é bastante usada para medir a eficiência do polimorfismo floral em promover a transferência de pólen cruzado. Vários estudos têm usado o polimorfismo dos grãos de pólen para verificar o número de grãos legítimos e ilegítimos depositados nos estigmas dos morfos florais em populações distílicas (Ganders 1979, Ree 1997, Lau & Bosque 2003, Ornelas *et al.* 2004, Massinga *et al.* 2005, Brys *et al.* 2008b, García-Robledo 2008, Valois-Cuesta *et al.* 2011, Martén-Rodríguez *et al.* 2013, Furtado 2015). A hercogamia recíproca atua favorecendo essa precisão na polinização e diminuindo os conflitos com a interferência do autopólen (Barrett 2002). No entanto, é interessante observar que outras características florais, como o tamanho da corola, ou a disponibilidade e quantidade de recursos, podem afetar o comportamento dos visitantes florais e, conseqüentemente, interferir no fluxo de pólen entre os morfos (Ornelas *et al.* 2004, Valois-Cuesta *et al.* 2011).

Em plantas hermafroditas, o fluxo de pólen pode ser diferente entre os indivíduos e isso pode fazer com que alguns indivíduos atuem mais como doadores de pólen ou como receptores

(Lloyd & Webb 1992). Além disso, os polimorfismos florais também podem atuar promovendo essa diferença nas funções sexuais entre indivíduos, nesse caso, entre morfos (García-Robledo 2008). Se o fluxo de pólen se mostra simétrico, conseqüentemente, a função sexual dos morfos exibe um potencial equivalente e espera-se que os morfos tenham um sucesso reprodutivo masculino e feminino iguais (García-Robledo 2008). Sendo assim, os polinizadores podem ser responsáveis por promover uma especialização sexual, por meio do fluxo de pólen assimétrico, que pode até evoluir ao dioicismo, a partir de uma condição distílica (García-Robledo 2008). A assimetria no fluxo de pólen não é um resultado raro entre morfos de espécies distílicas, contudo nem sempre as diferenças no fluxo de pólen refletem a produção de frutos (Stone 1995, Furtado 2015).

Rubiaceae é uma das poucas famílias vegetais que possuem espécies dióicas e heterostílicas em vários gêneros, demonstrando assim que a evolução desses sistemas parece ser variado no grupo (Barrett & Shore 2008, Sakai & Wright 2008). Além da presença de polimorfismos em diversos gêneros, vários padrões de transferência de pólen dos morfos florais tem sido registrados em espécies da família Rubiaceae (Wolff & Liede-Schumann 2007). Conhecer as interações de espécies distílicas com seus polinizadores pode fornecer informações importantes a respeito do papel dos visitantes na mudança evolutiva da hercogamia recíproca (Kissling & Barrett 2013). Muitas espécies que pertencem a grupos com hercogamia recíproca exata apresentam algum tipo de quebra na distilia (Ganders 1979, Barrett *et al.* 2009), nas quais são discutidas como resultado de distúrbios ecológicos envolvendo, frequentemente, assembleia de polinizadores (Pérez-Barrales & Arroyo 2010). Cada vez mais é preciso conhecer o real papel exercido pelos polinizadores no sistema reprodutivo de grupos distílicos, pois, desta forma, será possível entender as relações entre a eficiência desses polinizadores na transferência de pólen intermorfo e as variações do polimorfismo existentes em algumas populações.

Faramea multiflora pertence a um gênero que, praticamente, não possui trabalhos a respeito de sua biologia reprodutiva e, muito menos, dos processos ecológicos envolvidos em um sistema de polinização com visitantes noturnos e diurnos. Até o presente momento, existe um trabalho com *F. cyanea* desenvolvido na região do Triângulo Mineiro e dois com *F. occidentalis* na ilha de Barro Colorado no Panamá (Travers *et al.* 1998, Travers 1999), porém nenhum abordou a biologia reprodutiva e os aspectos ecológicos entre os morfos distílicos. *F. multiflora* é uma espécie pouco conhecida, ocorrendo em um bioma com uma intensa pressão antrópica, de modo que seu sistema reprodutivo pode fornecer informações que contribuam para o entendimento dos processos ecológicos associados com a distilia.

Objetivo Geral

Verificar o fluxo de pólen entre os morfos distílicos em uma população de *Faramea multiflora*.

Objetivos específicos

- i. Verificar a hercogamia entre os morfos florais;
- ii. Averiguar a diferenciação polínica entre os morfos florais;
- iii. Averiguar o fluxo de pólen entre os morfos e analisar a eficiência dos polinizadores noturnos e diurnos.

Material e métodos

Área de coleta e espécie estudada

O estudo foi desenvolvido em uma população no Parque Natural Municipal Santa Cruz (47°55'O e 18°9'S, 880 metros de altitude) nos meses de Janeiro e Fevereiro de 2015. O parque é um fragmento florestal localizado no município de Catalão, sudoeste de Goiás, Brasil, circundado por bairros residenciais e pastagens. Possui, aproximadamente, 29 ha onde a fitofisionomia de Cerrado predominante é a Mata Mesofítica (Ferreira & Consolaro 2013).

Faramea multiflora pertence a um gênero neotropical com distribuição desde a América Central e Meridional até a Bolívia e o Brasil, sendo comum em Matas de Galeria e Florestas Úmidas de Encostas (Delprete 2010). Trabalho prévio realizado com a mesma população demonstrou que a espécie apresenta polinizadores noturnos e diurnos e um possível relaxamento no sistema de incompatibilidade (Eduardo 2012). É uma espécie arbustiva que na área de estudo os indivíduos, raramente, atingiram 1,50 m de altura.

Morfometria floral

Foram coletadas, aleatoriamente, e fixadas em álcool (70%) 60 flores por morfo de 10 indivíduos. A morfometria floral foi realizada por meio de fotos digitais e programa de mensuração de imagem (ImageJ), sendo retiradas as seguintes medidas: comprimento dos estames (base da corola até o meio da antera), comprimento do estilete (base da corola a base do estigma), comprimento dos lobos estigmáticos (base do estigma até seu ápice) e comprimento do tubo da corola. A altura do estigma foi calculada pela soma do comprimento do estilete e comprimento dos lobos estigmáticos/2. Esse cálculo foi aplicado para não superestimar a altura

do estigma, uma vez que ele é bífido e, em condições naturais, se encontra aberto. As análises morfométricas foram realizadas a partir de uma ANOVA (Ayres *et al.* 2003) (Bioestat 5.3).

Ao longo de um transecto de ca. de 800m foram morfotipados todos os indivíduos para averiguar a isopleτία. O teste de Qui-quadrado foi realizado para análise de proporção entre os morfos (Ayres *et al.* 2003) (Bioestat 5.3).

A hercogamia recíproca foi calculada usando dois índices. Primeiro, foi realizado o Índice de Reciprocidade de Richards & Koptur (1993), que é dado pela $(\text{altura da antera} - \text{altura do estigma recíproco}) / (\text{altura da antera} + \text{altura do estigma recíproco})$. Esse índice quantifica, separadamente, a reciprocidade média entre os órgãos sexuais superiores e inferiores, sendo que o índice utiliza o valor de 0,0 como faixa de perfeição, porém números entre 0,05 e -0,05 ainda são aceitáveis. Foi utilizado também o Índice de Sánchez *et al.* (2013), que se baseia na comparação da posição relativa do estigma de um morfo com altura das anteras de todas as outras flores do morfo oposto na população. Segundo esse índice, a reciprocidade perfeita ocorre quando os valores estão acima de 0,95, com um valor máximo de 1,0 (Sánchez *et al.* 2013). A descrição completa do índice e o software para o desenvolvimento da análise está disponível em <http://webs.uvigo.es/plantecology/software.es.html>.

Dimorfismo do pólen

Os grãos de pólen foram coletados de uma antera por botão, distribuídos em 30 indivíduos de cada morfo. Os botões foram fixados em álcool 70% e as medidas foram realizadas em 20 grãos de pólen por antera ($N=1200$). Para realizar essas medidas, as anteras foram destacadas e colocadas em placas de petri com gel de fuxina e, na sequência, foram capturadas imagens digitais dos grãos de pólen utilizando um microscópio com câmera digital acoplada a fim de determinar a presença do dimorfismo entre os morfos. A diferença estatística no tamanho dos grãos foi averiguada com teste U (Mann-Whitney/Bioestat 5.3).

Os grãos de pólen, após a averiguação, foram alocados em classes de tamanho a fim de organizá-los em uma distribuição de frequência. A partir da distribuição, foi observado classes de tamanho específicas de cada morfo e classes com sobreposição. Os grãos justapostos foram submetidos a faixas de sobreposição relativa, nas quais permitiram eleger a qual morfo eles pertenciam. Trabalho de García-Robledo (2008) utilizou a sobreposição máxima de 37% para atribuir uma classe de tamanho ao morfo longistilo ou brevistilo. Grãos que se encontravam acima desse valor não entraram na amostragem.

Transferência de pólen

O fluxo de pólen intermorfo foi averiguado nos dois períodos de estudo a partir da diferenciação do diâmetro dos grãos de pólen sobre a superfície estigmática de cada morfo. Foram realizados os seguintes tratamentos: emasculado e coletado (EC), emasculado e coletado no final da longevidade (ECF) e controle (C). Todos os tratamentos foram realizados nos dois turnos, de modo que para o período diurno o final da longevidade foi considerado como o final da tarde e para o período noturno, o início da manhã. O tratamento EC foi realizado apenas para averiguar a ação da emasculação na carga polínica final dos estigmas, não entrando na análise final dos resultados, uma vez que não foi detectada interferência no manuseio das flores. Para cada tratamento, foram coletados 20 pistilos por morfo e, posteriormente a coleta, a região do estigma-estilete foi retirada e acoplada em lâmina com gel de fuxina para qualificar e examinar a carga polínica. A probabilidade do fluxo de pólen legítimo foi calculada pela razão de pólen legítimos nos estigmas analisados com a quantidade total de pólen encontrado. Análises entre tratamentos e entre morfos foram feitas usando uma ANOVA (Bioestat 5.3).

A quantidade de grãos de pólen produzido foi mensurada em 20 flores de 20 indivíduos de cada morfo. Os grãos foram contabilizados em uma antera por flor e, posteriormente, multiplicado pela quantidade de anteras por flor, no caso quatro (Cruden 1977). Botões e flores para essas análises foram coletados e armazenados em álcool 70% antes das análises.

A capacidade de cada morfo doar (função masculina) e receber (função feminina) pólen foi analisado pelo protocolo proposto por Lloyd & Webb (1992).

$$T_{ij} = \frac{(x \text{ pólen sobre o estigma})_{ij} \times (N^\circ \text{ de flores})_j}{(N^\circ \text{ de pólen/Flor}) \times (N^\circ \text{ de flores})_i}$$

No qual T_{ij} é a probabilidade de um único grão de pólen do tipo “i” ser transferido para o estigma do tipo “j”, $(x \text{ pólen sobre o estigma})_{ij}$ é o número médio de grãos de pólen “i” sobre cada estigma “j” e o “i” e o “j” representam ambos os morfos. Os valores gerados pela fórmula foram comparados para estimar as funções masculina e feminina, não havendo faixas de valores que expressam mais uma função do que outra (e.g. valores de 0 a 1).

Resultados

Morfometria floral

Os dados de morfometria floral estão representados na Tabela 1. Não foi encontrada diferença significativa entre os morfos apenas no comprimento do tubo da corola. A morfometria

mostrou que a altura das anteras dos dois morfos apresentou diferença significativa, sendo as anteras do morfo brevistilo maiores que a do longistilo. O mesmo foi encontrado no diâmetro do grão de pólen. Os valores para o comprimento do estilete também foram, significativamente, distintos, com o morfo longistilo apresentando tamanho superior (ver Tabela 1).

O cálculo do Índice de Reciprocidade de Richards & Koptur (1993) apresentou um valor de $0,07 \pm 0,05$ para os órgãos inferiores e $0,82 \pm 0,16$ para os superiores, sendo considerada recíproco e não recíproco, respectivamente. A população estudada obteve o valor de 0,11 para o índice de reciprocidade Sánchez *et al.*, (2013), representando uma baixa reciprocidade na população.

Tabela 1. Dados morfométricos de flores brevistilas e longistilas de *Faramea multiflora* no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. As medidas estão em milímetros, mas em micrometros para os grãos de pólen. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) usando o teste estatístico (ANOVA). $N = 59$ para as medidas das peças florais e $N = 1200$ para o diâmetro polínico.

Característica morfométrica	Média \pm Desvio padrão	
	Brevistilo	Longistilo
Comprimento do tubo da corola	7,84 \pm 0,56 a	7,73 \pm 0,51 a
Altura dos estames	7,60 \pm 0,56 a	5,57 \pm 0,44 b
Comprimento das anteras	3,70 \pm 0,23 a	3,44 \pm 0,27 b
Comprimento dos lobos estigmáticos	1,46 \pm 0,21 a	1,99 \pm 0,28 b
Altura do pistilo	3,99 \pm 0,29 a	10,72 \pm 0,65 b
Diâmetro polínico	5,99 \pm 0,78 a	4,81 \pm 0,84 b

Dimorfismo polínico

O morfo brevistilo apresentou diâmetro, significativamente, maior em comparação com os valores do morfo longistilo ($U=20,99$ $p < 0,0001$). A distribuição de classes encontrou que mais de 40% dos grãos de pólen mensurados estavam localizados na classe com maior sobreposição entre os morfos (5-6) (Figura 1). Outras duas classes também tiveram sobreposição (4-5 e 6-7), no entanto os valores de sobreposição para essas duas classes ficaram abaixo de 18%, sendo possível classificá-los como pertencentes ao morfo longistilo (4-5) e ao morfo brevistilo (6-7).

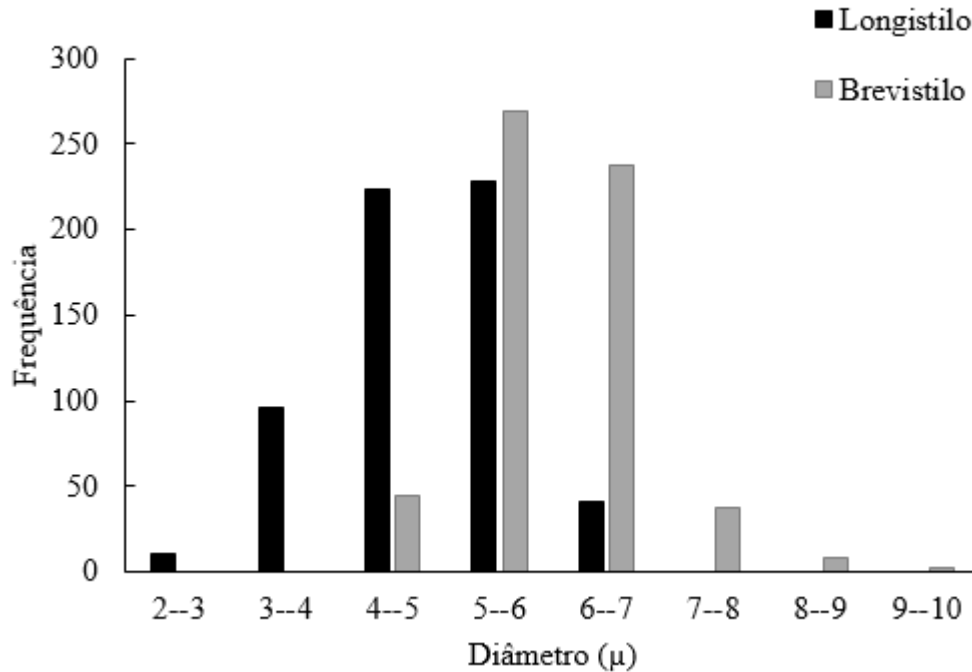


Figura 1. Distribuição de frequência do diâmetro dos grãos de pólen dos morfos florais de *Faramaea multiflora* no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil.

Transferência e produção de pólen

Não foi observado diferença significativa na produção de pólen entre os morfos de *F. multiflora* na população estudada. No morfo brevistilo foi encontrado em média $417,5 \pm 34,87$ grãos e no longistilo foi encontrado $404,19 \pm 65,57$ ($t=1,9832$ $p=0,194$) nas anteras. Por flor, o morfo brevistilo produziu em média $1634,5 \pm 123,6$ e o longistilo $1578 \pm 149,98$ grãos de pólen ($t=2,323$; $p=0,097$).

Foi encontrada diferença significativa na carga polínica entre os estigmas do morfo brevistilo e do morfo longistilo, quando consideramos os dois períodos, tendo o brevistilo maior carga polínica do que o longistilo (Figura 2A). No entanto, não foi observada tal diferença entre os morfos nos estigmas polinizados durante o dia (Figura 2B), apenas nos estigmas do período noturno (Figura 2C). Dentro dos tratamentos, houve diferença significativa entre os morfos apenas no tratamento Controle (C), na soma dos dois períodos ($F=10,2214$ $p=0,002$) e durante o dia ($F=18,22$ $p=0,003$), mas não à noite ($F=3,5397$ $p=0,06$), com o morfo brevistilo apresentando mais grãos de pólen nos estigmas. Nos dois casos o morfo brevistilo recebeu mais grãos de pólen em comparação com o morfo longistilo. Nas flores emasculadas e coletadas ao final do dia (E.C.F), a carga polínica não apresentou diferença significativa entre os morfos em

todos os casos ($F=0,7758$ $p=0,61$; $F=0,06$ $p=0,80$; $F=0,9730$ $p=0,66$ soma de ambos os períodos, durante o dia e à noite, respectivamente).

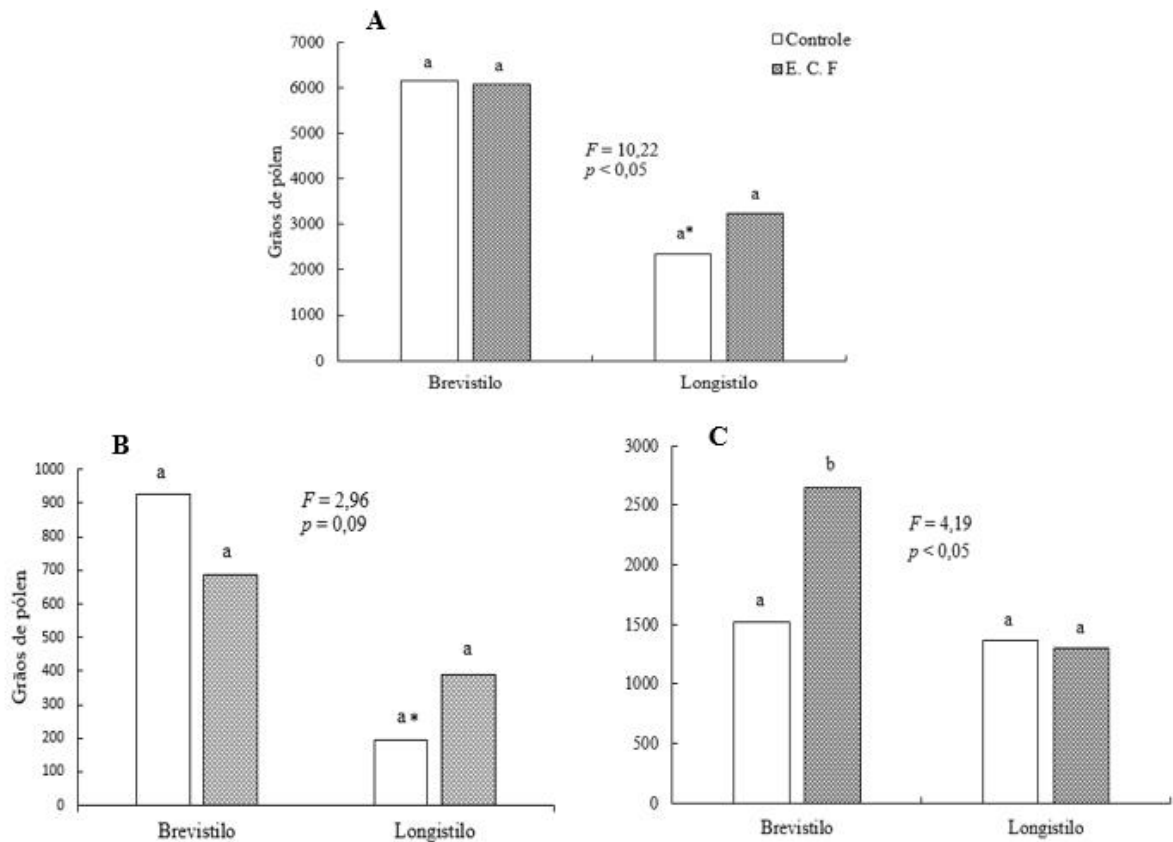


Figura 2. Número de grãos de pólen por indivíduo de *Faramaea multiflora* no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. **A:** Carga polínica nos dois períodos estudados. **B:** Carga polínica durante o dia. **C:** Carga polínica do período noturno. O valor de F no centro representa a comparação da quantidade total de grãos entre morfos. Dentro de cada morfo, letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$). Os asteriscos simbolizam a comparação entre os morfos para o mesmo tratamento ($p < 0,05$).

Em relação a qualidade dos grãos de pólen, os estigmas do morfo brevistilo apresentaram mais grãos legítimos em comparação com o morfo longistilo na somatória total, porém, o morfo brevistilo não apresentou mais grãos legítimos nos turnos separados (Figura 3). Dentro de cada morfo, não houve diferenças na quantidade de pólen legítimo entre os tratamentos realizados em todos os casos (Figura 3). Analisando por tratamento, houve diferença significativa na quantidade de grãos legítimos tanto no Controle quanto no E.C.F, sempre com o morfo brevistilo apresentando mais grãos legítimos em comparação com o morfo longistilo ($F=5,923$ $p < 0,05$; $F=3,187$ $p < 0,05$, Controle e E.C.F, respectivamente) na somatória dos dois períodos.

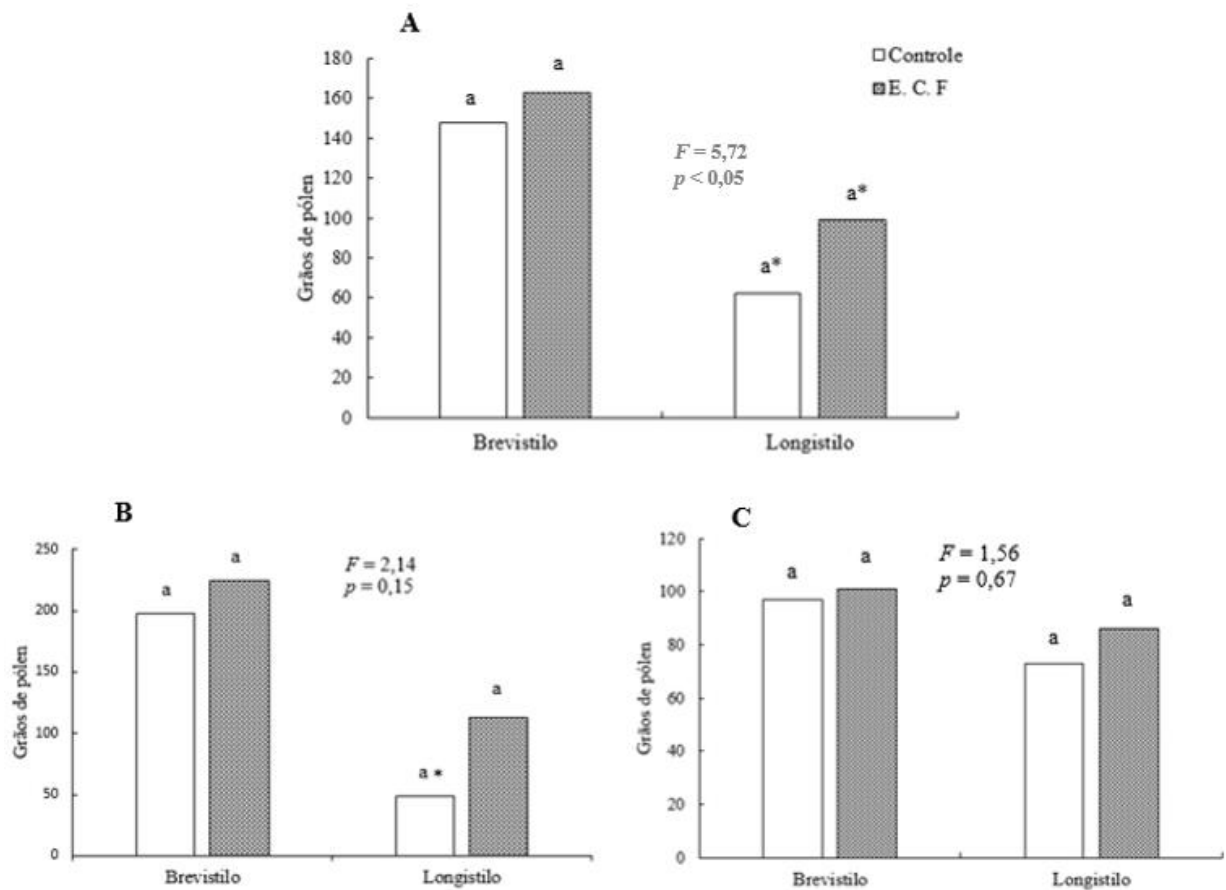


Figura 3. Número médio de grãos de pólen legítimos por indivíduo de *Faramea multiflora* no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. **A:** Carga polínica nos dois períodos estudados. **B:** Carga polínica durante o dia. **C:** Carga polínica do período noturno. O valor de F no centro representa a comparação da quantidade total de grãos entre morfos. Dentro de cada morfo, letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$). Os asteriscos simbolizam a comparação entre os morfos para o mesmo tratamento ($p < 0,05$).

Ainda em relação a qualidade dos grãos de pólen, os estigmas do morfo brevistilo e longistilo não apresentaram diferença significativa no número médio de grãos de pólen ilegítimos em nenhum dos períodos e na soma total (Figura 4). Dentro de cada morfo, também não houve diferenças na quantidade de pólen legítimo entre os tratamentos realizados em todos os casos (Figura 4). No entanto, houve diferença significativa entre os morfos, quando analisamos os tratamentos separados, com o morfo brevistilo apresentando um número de grãos ilegítimos significativamente maior apenas no tratamento Controle ($F=1,8843$ $p < 0,05$). Essa diferença foi observada também durante o dia ($F=3,6554$ $p < 0,05$), mas não à noite ($F=0,1127$ $p=0,19$) (Figura 4).

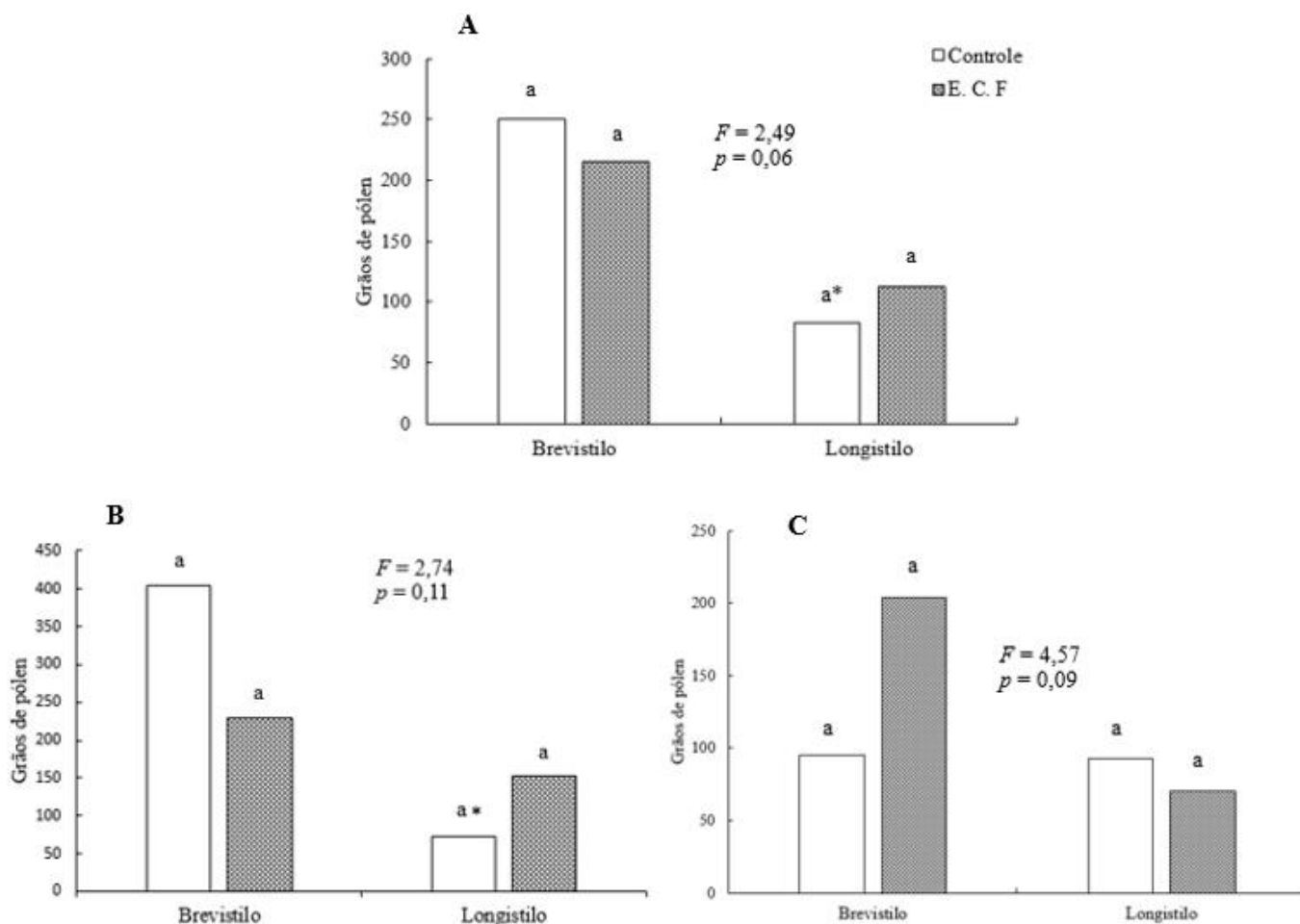


Figura 4. Número médio de grãos de pólen ilegítimos por indivíduo de *Faramaea multiflora* no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. **A:** Carga polínica nos dois períodos estudados. **B:** Carga polínica durante o dia. **C:** Carga polínica do período noturno. O valor de F no centro representa a comparação da quantidade total de grãos entre morfos. Dentro de cada morfo, letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$). Os asteriscos simbolizam a comparação entre os morfos para o mesmo tratamento ($p < 0,05$).

Dentro de cada tratamento, o morfo brevistilo mostrou diferença significativa na quantidade de pólen ilegítimo em comparação com a quantidade de pólen legítimo nos estigmas. Ao contrário, para o morfo longistilo, não foi observado diferenças significativas entre pólen legítimo e ilegítimo nos dois tratamentos. Os resultados dessas análises são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Quantidade de grãos em estigmas nos tratamentos de transferência de pólen em *Fareamea multiflora* no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. Tratamentos: Controle, (E.C.F.) Emasculado e coletado no final da longevidade. Morfos: B (brevistilo), L (longistilo).

Tratamento	Morfo	Pólen Legítimo*	Pólen Ilegítimo*	F	p
Controle	B	1471 (147,1 ± 143,7)	2495 (249,5 ± 165,4)	5,67	<0,05
	L	612 (61,2 ± 25,6)	826 (82,6 ± 61,6)	2,21	0,48
E.C.F	B	1628 (162,8 ± 112,6)	2167 (216,7 ± 272,1)	1,65	<0,05
	L	989 (98,9 ± 66,78)	1116 (111,6 ± 123,4)	3,34	0,31

* Média e desvio padrão entre parênteses.

Os dois morfos não mostraram diferença significativa na probabilidade de receber grãos provenientes de polinização legítima, em todos os períodos e na somatória final. No tratamento E.C.F, também não houve diferença entre os dois morfos na probabilidade de receber pólen legítimo ($F= 1,347$ $p= 0,43$; $F= 0,009$ $p= 0,76$; $F= 0,01$ $p= 0,65$ na soma total, durante o dia e à noite, respectivamente). Da mesma forma, o tratamento Controle não mostrou diferenças significativas entre os morfos na probabilidade de receber grãos provenientes de cruzamentos legítimos ($F= 2,87$ $p= 0,09$; $F= 3,214$ $p= 0,18$; $F= 0,23$ $p= 0,32$ na soma total, durante o dia e à noite, respectivamente). Dentro de cada morfo, não houve diferenças significativas na probabilidade de receberem grãos de pólen legítimos entre os tratamentos (Figura 5).

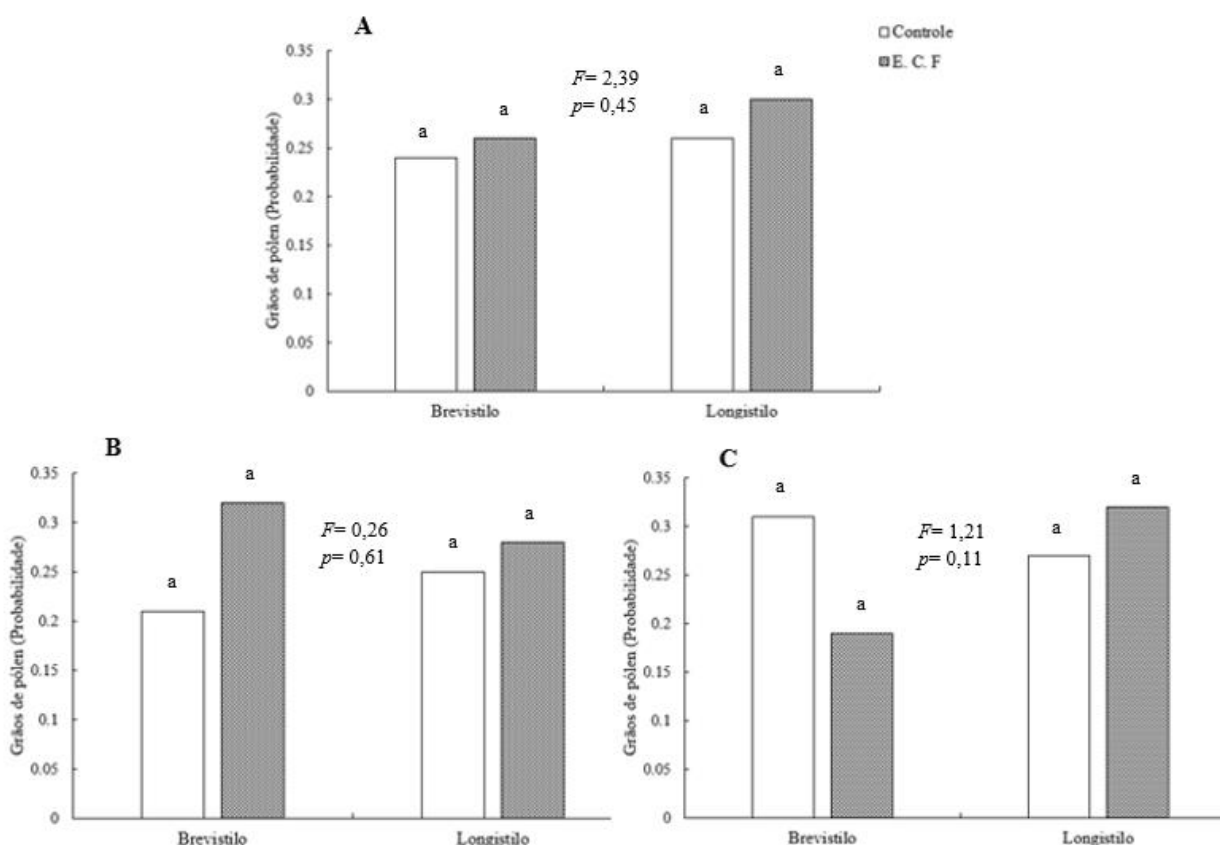


Figura 5. Número médio de grãos de pólen legítimos por indivíduo de *Fareamea multiflora* no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. **A:** probabilidade durante os dois períodos. **B:** probabilidade durante o dia. **C:** probabilidade à noite. O valor de F no centro representa a comparação da quantidade total de grãos entre morfos. As letras representam entre tratamentos dentro de cada morfo (Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$).

Assim como na polinização legítima, os dois morfos não mostraram diferença significativa na probabilidade de receber grãos provenientes de polinização ilegítima, em todos os períodos e na somatória final. Na soma total dos dois períodos houve diferença significativa na probabilidade apenas no tratamento controle, com o morfo brevistilo, apresentando uma probabilidade maior de receber grãos ilegítimos ($F = 5,434$ $p = 0,03$). Dentro de cada morfo, houve diferença significativa apenas na probabilidade total de receberem grãos de pólen ilegítimos entre os tratamentos no morfo brevistilo na somatória dos dois períodos (Figura 6).

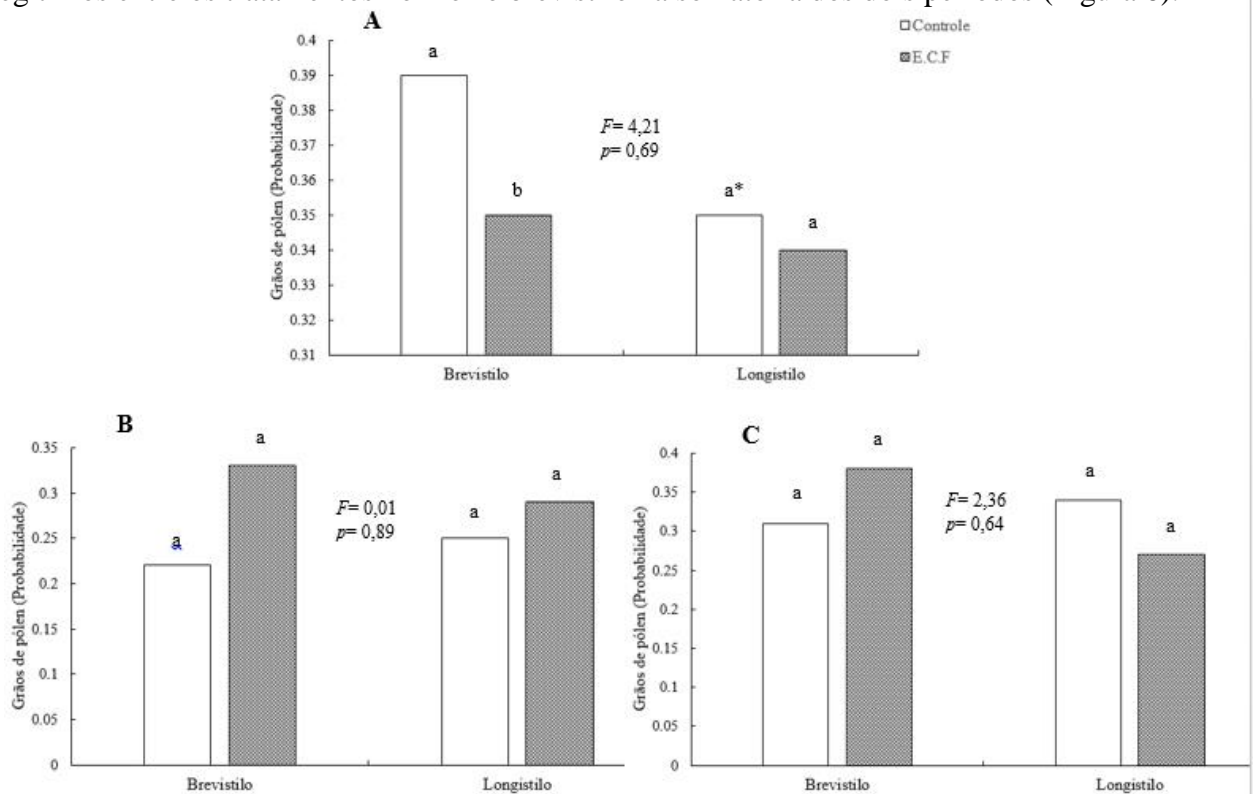


Figura 6. Número médio de grãos de pólen ilegítimos por indivíduo de *Fareamea multiflora* no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. **A:** probabilidade durante os dois períodos. **B:** probabilidade durante o dia. **C:** probabilidade à noite. O valor de F no centro representa a comparação da quantidade total de grãos entre morfos. As letras representam entre tratamentos dentro de cada morfo (Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$).

A capacidade de cada morfo doar e receber grãos de pólen dentro dos tratamentos foi assimétrica para o morfo brevistilo, apresentando uma capacidade maior de doação ilegítima nos

dois tratamentos. No entanto, o morfo longistilo obteve resultado inverso, tendo uma capacidade maior de doação legítima nos dois tratamentos. O morfo brevistilo apresentou uma capacidade de receber grãos legítimos maior no tratamento emasculado e capacidade igual no controle. Já o morfo longistilo teve uma capacidade de receber grãos ilegítimos maior nos dois tratamentos. Quanto a função masculina, o morfo longistilo apresentou valores maiores que o morfo brevistilo em relação a polinização legítima, mas o morfo brevistilo apresentou função masculina maior quanto à polinização ilegítima. Para a função feminina, o morfo brevistilo apresentou valores maiores tanto pra pólen legítimo quanto para ilegítimo em comparação com o morfo longistilo (Tabela 4).

Tabela 4. Proficiências da função masculina (doador) e feminina (receptor) (T_{ij}) de *Faramea multiflora* no Parque Natural Municipal Santa Cruz, Catalão, Goiás, Brasil. Não há intervalos de valores que expressam mais uma função do que outra (e.g. valores de 0 a 1), simplesmente, os T_{ij} podem ser comparados para estimar as funções masculina e feminina, tanto entre morfos quanto entre tratamentos. Controle, (E.C.F) emasculado e coletado no final do dia.

Tratamentos	Doador	Receptor (T_{ij})	
		Brevistilo	Longistilo
Controle	Brevistilo	$3,8 \times 10^{-2}$	$5,6 \times 10^{-3}$
	Longistilo	$3,8 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-2}$
E. C. F	Brevistilo	$3,3 \times 10^{-2}$	$9,1 \times 10^{-3}$
	Longistilo	$4,2 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-2}$

Discussão

A população estudada de *Faramea multiflora* mostrou desvio na hercogamia recíproca, apresentando reciprocidade justamente entre os verticilos sexuais inferiores, os quais foram os que receberam maior fluxo compatível de pólen. O morfo longistilo apresentou uma reciprocidade baixa e um fluxo assimétrico de pólen compatível. Darwin (1877) propôs em seu modelo que o arranjo morfológico recíproco apareceu, evolutivamente, como uma maneira de potencializar a transferência de pólen legítimo, por meio da deposição de pólen em partes específicas do corpo dos polinizadores. Alguns estudos posteriores ao modelo proposto por Darwin também apontam que a hercogamia recíproca reduz a interferência sexual, evitando assim o desperdício de pólen que ocorreria na autopolinização e na polinização cruzada intramorfo (Baker 1964, Webb & Lloyd 1986). No entanto, o comportamento e a frequência dos polinizadores podem afetar o fluxo de pólen, levando a uma polinização legítima assimétrica

(Valois-Cuesta *et al.* 2011). Assimetria no fluxo de pólen foi observada em *Palicourea fendleri* e *Psychotria nitidula*, populações com desvio na hercogamia recíproca (Lau & Bosque 2003, Furtado 2015). Mesmo resultado foi observado no presente estudo com a população de *F. multiflora*, apresentando assimetria no fluxo de pólen conjuntamente ao desvio observado na hercogamia recíproca. Alguns trabalhos discutem que uma população distílica sem hercogamia recíproca e, provavelmente com desvios no fluxo de pólen, pode se manter isoplética quando o sistema de incompatibilidade é atuante (Maruyama *et al.* 2010, Furtado 2015), discussão essa que é confirmada com a população estudada de *F. multiflora*, uma vez que o morfo brevistilo se mostrou autocompatível e 3,5 mais frequente do que o longistilo (dados do primeiro capítulo).

No presente estudo, *F. multiflora* apresentou diferenças no diâmetro dos grãos de pólen entre os morfos, no entanto a produção de pólen foi a mesma entre os morfos. Os estudos pioneiros de distília discutem que tanto a produção de pólen, quanto o dimorfismo no tamanho polínico podem estar relacionados ao crescimento do tubo (Darwin 1877, Bahadur 1968, Ganders 1979, Barrett 1992). Neste caso, o morfo brevistilo deveria produzir grãos de pólen maiores, já que eles necessitam percorrer um caminho mais longo no estilete do morfo longistilo, precisando assim, de uma reserva energética maior, no entanto com grãos maiores era de se esperar que o morfo brevistilo produzisse uma quantidade menor de grãos por antera. Situação inversa deveria ocorrer com o morfo longistilo (Ganders 1979, Barrett 1992). Em *F. multiflora*, a diferença no diâmetro dos grãos entre morfos corrobora os estudos citados, entretanto a produção de pólen foi igual entre os morfos. Alguns estudos discutem que uma quantidade baixa de nutrientes no solo podem afetar essas duas características do pólen (Lau & Stephenson 1994, Wolff & Liede-Schumann 2007), contudo no presente estudo com *F. multiflora* não foi verificado os fatores abióticos que podem estar ligados a produção de pólen igual entre os morfos.

Com a reciprocidade encontrada apenas nos verticilos baixos, era de se esperar que os estigmas do morfo brevistilo recebessem maior quantidade de grãos legítimos (Lau & Bosque 2003; Furtado 2015). Essa diferença foi confirmada na população estudada de *F. multiflora* e os estigmas do morfo brevistilo apresentaram mais grãos legítimos do que o morfo oposto. Esse resultado demonstra a funcionalidade da hercogamia recíproca na população estudada, tendo em vista que os estigmas do morfo brevistilo apresentaram reciprocidade com as anteras do morfo oposto, enquanto que o contrário não foi verdadeiro. Considerando a falta de reciprocidade entre os verticilos superiores, era provável que o morfo longistilo apresentasse uma maior quantidade de pólen ilegítimo em comparação com o morfo brevistilo (Furtado 2015), porém os dois morfos

receberam quantidades iguais de pólen ilegítimo. Os padrões de transferência de pólen encontrados demonstram que a funcionalidade desse sistema pode variar entre plantas da mesma população, entre diferentes populações da mesma espécie e ao longo do tempo, sendo que os polinizadores são um dos grandes responsáveis (Hernandez & Ornelas 2007). Se os polinizadores continuarem a promover um fluxo assimétrico, a especialização sexual pode evoluir a dioiccia extrema a partir de uma condição distílica (García-Robledo 2008) ou a população se tornar monomórfica brevistila. Apesar dos dois morfos apresentarem diferenças no fluxo de pólen, eles parecem estar recebendo quantidades suficientes para que ocorra fecundação tanto legítima quanto ilegítima, lembrando que eles produzem, em média, apenas dois óvulos por flor.

Os resultados demonstraram que o morfo longistilo de *F. multiflora* desempenhou uma maior função masculina ao doar mais pólen legítimo, enquanto o morfo brevistilo teve uma função feminina maior. Segundo Lloyd & Webb (1992), essa capacidade masculina e feminina deveria ser igual para não ocasionar distúrbios reprodutivos em populações distílicas, contudo essa diferença também já foi relatada em outras espécies distílicas (Stone & Thomson 1994, González *et al.* 2005, García-Robledo 2008, Keller *et al.* 2014, Furtado 2015). Em *F. multiflora*, o sistema de incompatibilidade não funciona com rigidez (ver detalhes do primeiro capítulo), principalmente no morfo brevistilo, e mesmo recebendo mais grãos legítimos bastaria apenas dois grãos ilegítimos para fecundar os óvulos formados em suas flores. O que pode estar havendo na população estudada de *F. multiflora* é um desvio na aptidão reprodutiva dos morfos, já que foi observado uma diferença na proporção dos morfos na população (ver detalhes do primeiro capítulo), o que pode levar até a perda total do morfo auto-incompatível, no caso o longistilo, e a população se tornar monomórfica brevistila. Em um estudo com *Psychotria carthagenensis* no Triângulo Mineiro, foi encontrada uma situação parecida, mas a monomorfia com autocompatibilidade se manifestou no morfo longistilo, o que parece ser mais comum de ocorrer (Hamilton 1990, Barrett 1992, Consolaro *et al.* 2011).

Os dois grupos de polinizadores, diurnos e noturnos, parecem estar contribuindo de forma diferente para o fluxo de pólen na população de *F. multiflora* aqui estudada. Durante o dia, os estigmas do morfo brevistilo apresentaram uma quantidade maior de grãos ilegítimos em comparação com o morfo longistilo, no tratamento Controle. Essa diferença não foi observada à noite e nem em flores emasculadas durante o dia, sendo provável que os visitantes diurnos possam estar contribuindo com a deposição de pólen da própria antera (autopólen). Em relação a deposição de pólen legítimo, o morfo brevistilo também apresentou mais grãos de pólen em seus

estigmas, contudo, no período noturno não foi observada tal diferença e durante o dia apenas no tratamento Controle. Os dois grupos de polinizadores observados são conhecidos por apresentarem probóscide longa e alguns estudos ponderam que esse tipo de polinizador pode ser mais eficiente no fluxo de pólen em espécies distílicas pelo fato da probóscide alcançar os verticilos inferiores (Ferrero *et al.* 2011, Keller *et al.* 2014). Como observado no presente estudo, o morfo brevistilo de *F. multiflora* apresentou mais grãos legítimos do que o morfo longistilo, talvez, em razão dessa capacidade dos dois grupos de polinizadores em atingir os verticilos inferiores e ainda pelo fato da população ter apresentado hercogamia recíproca apenas nestes verticilos. Por outro lado, o morfo brevistilo também apresentou mais grãos ilegítimos do que legítimos em seus estigmas, enquanto o morfo longistilo não mostrou diferença na qualidade do pólen. Isso pode ter ocorrido devido a maior taxa de visitação no morfo brevistilo e uma possível contribuição dos polinizadores ao depositarem pólen das próprias anteras da flor visitada.

Em conclusão, não foi observado diferença na produção de pólen entre os morfos de *Faramea multiflora*, no entanto o morfo brevistilo apresentou uma maior função feminina enquanto o morfo longistilo obteve uma maior função masculina. Devemos ressaltar que a população estudada apresentou hercogamia recíproca apenas entre os verticilos baixos, o que explica o porquê do morfo brevistilo receber mais grãos legítimos, já que seu estigma é recíproco às anteras do morfo longistilo. A hercogamia recíproca favorece a deposição de pólen, mas os polinizadores são os agentes na transferência dos grãos e os dois grupos observados mostraram uma taxa maior de visitas no morfo brevistilo. Isso pode explicar por que o morfo brevistilo teve uma função masculina maior na doação de pólen ilegítimo, já que os visitantes frequentaram mais flores desse morfo. No entanto, estudos com a deposição de pólen no corpo do polinizador precisam ser feitos, principalmente após experimentos de primeira visita, como observado em *Psychotria nitidula*, para verificarmos em que partes do corpo dos diferentes polinizadores os grãos de pólen têm sido depositados (Furtado 2015).

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados observados na presente dissertação fornecem informações importantes a respeito da biologia reprodutiva de *Faramea multiflora* e ainda sobre o funcionamento da distilia em relação ao fluxo de pólen na população estudada. No entanto, alguns pontos precisam ser melhor estudados para responder lacunas abertas com o presente trabalho. A população estudada apresentou distilia atípica, com o desvio na hercogamia recíproca, falta do sistema de incompatibilidade e um desvio na proporção dos morfos, sendo que a maior parte da população é composta por indivíduos do morfo brevistilo. Semelhante a outras espécies do gênero, *F. multiflora* apresentou um sistema de polinização generalista, com visitantes noturnos e diurnos, sendo que ambos visitaram mais flores de indivíduos brevistilos. Os dois grupos principais de polinizadores, visitam as flores de *F. multiflora* buscando o néctar como recurso, no entanto, a análise da quantidade de néctar e concentração de açúcar precisam ser realizadas para, talvez responder o número maior de visitas no morfo brevistilo.

Quanto a funcionalidade da distilia, foi observado que a hercogamia recíproca promove a polinização cruzada no presente trabalho, já que o desvio na reciprocidade entre os verticilos reprodutivos correspondeu a uma transferência de pólen assimétrica, com o morfo brevistilo recebendo mais grãos de pólen provenientes de polinização legítima. No entanto, experimentos de primeira visita são necessários para verificar a eficiência dos polinizadores e também coletar polinizadores após essa visita para verificar a deposição de pólen nas diferentes partes do corpo. Juntamente a isso, estudos futuros são necessários com outras populações de *F. multiflora* a fim de determinar se o sistema de polinização generalista é comum na espécie, ou está restrito a área estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Rodríguez, P.A., Krömer, T, García-Franco, J.G. & MacSwiney G. M.C. 2016. From dusk till dawn: nocturnal and diurnal pollination in the epiphyte *Tillandsia heterophylla* (Bromeliaceae). *Plant Biology* 18: 37-45.
- Aigner, P.A. 2004. Floral specialization without trade-offs: optimal corolla flare in contrasting pollination environments. *Ecology* 85: 2560-2569.
- Amorim, F.W. & Oliveira, P.E. 2006. Estrutura sexual e ecologia reprodutiva de *Amaioua guianensis* Aubl. (Rubiaceae), uma espécie dióica de formações florestais de cerrado. *Revista Brasil. Bot.* 29(3): 353-362.
- Anderson, W.R. 1973. A Morphological hypothesis for the origin of heterostyly in the Rubiaceae. *Taxon*, 22(5/6): pp. 537-542.
- Armbruster, W.S. & Baldwin, B.G. 1998. Switch from specialised to generalized pollination. *Nature* 394: 632.
- Ayres M., Júnior A.M., Ayres D.L. & Santos A.S. 2003. BioEstat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém.
- Bahadur, B. 1968. Pollen dimorphism in three heterostyled Rubiaceae. *Rev. Palaeobotan. Palynol.* 7: 233-239.
- Baker, H.G. 1964. Variation in style length in relation to outbreeding in *Mirabilis* (Nyctaginaceae). *Evolution* 18: 507-509.
- Barrett, S.C.H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: Model systems for evolutionary analysis. *In* *Evolution and Function of Heterostyly*. p.1-29.
- Barrett, S.C.H. 2002. The Evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews.* 3: 274-284.
- Barrett, S.C.H., Jesson, L.K. & Baker, A.M. 2000. The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. *Annals of Botany* 85: 253-265.
- Barrett, S.C.H., Ness, R.W. & Vallejo-Marín, M. 2009. Evolutionary pathways to selffertilization in a tristylous plant species. *New Phytologist* 183(3): 546-556.

- Barrett, S.C.H. & Shore, J.S. 1987. Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* L. complex (Turneraceae). *Evolution* 41: 340-354.
- Barrett, S.C.H., & Shore, J.S. 2008. New insights on heterostyly: comparative biology, ecology and genetics. pp 3-32 *In* Franlin-Tong, V. E. (ed.). *Self-incompatibility in flowering plants*. Springer-Verlag, Berlin.
- Bawa, K.S. & Beach, J.H. 1983. Self-Incompatibility systems in the Rubiaceae of a Tropical Lowland Wet Forest. *Amer. J. Bot.* 70(9): 1281-1288.
- Bawa, K.S., Bullock, S.H., Perry, D.R., Coville, R.E. & Grayum, M.H., 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination systems. *Am. J. Bot.* 72: 346-356.
- Bencke, C.S.C. & Morellato, L.P.C. 2002. Estudo comparativo da fenologia de nove espécies arbóreas em três tipos de floresta atlântica no sudeste do Brasil. *Revista Brasil. Bot.* 25(2): 237-248.
- Brito, V.L.G., Fendrich, T.G., Smidt, E.C., Varassin, I.G. & Goldenberg, R. 2016. Shifts from specialised to generalised pollination systems in Miconieae (Melastomataceae) and their relation with anther morphology and seed number. *Plant Biology*. doi:10.1111/plb.12432.
- Brys, R., Jacquemyn, H. & Beeckman, T. 2008a. Morph-ratio variation, population size and female reproductive success in distylous *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *J. Evol. Biol.* 21: 1281-1289.
- Brys, R., Jacquemyn, Hermy, M & Beeckman, T. 2008b. Pollen deposition rates and the functioning of distyly in the perennial *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *Plant Syst Evol* (2008) 273: 1-12.
- Bullock, S.H. 1985. Breeding Systems in the Flora of a Tropical Deciduous Forest in Mexico. *Biotropica* 17(4): 287-301.
- Castro, C.C. & Araújo, A.C. 2004. Distyly and sequential pollinators of *Psychotria nuda* (Rubiaceae) in the atlantic rain forest, Brazil. *Plant Syst. Evol.* 244: 131-139.
- Castro, C.C., Oliveira, P.E. & Alves, M.C. 2004. Breeding system and floral morphometry of distylous *Psychotria* L. species in the Atlantic Rain Forest, SE Brazil. *Plant Biology* 6: 755-760.

- Coelho, C.P. & Barbosa, A.A. 2004. Biologia Reprodutiva de *Psychotria poeppigiana* (Rubiaceae) em mata de galeria. *Acta bot. bras.* 18(3): 481-489.
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. 1979. A model for the evolution of distyly. *American Naturalist* 114: 467-498.
- Consolaro, H. 2008. A distilia em espécies de Rubiaceae do bioma cerrado. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Programa de Pós-graduação em Ecologia, 115p.
- Consolaro, H., Silva, S.C.S. & Oliveira, P.E. 2011. Breakdown of distyly and pin-monomorphism in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Plant Species Biology* 26: 24–32.
- Cruden, R.W. 1977. Pollen-Ovule Ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.
- Darwin, C. 1877. Different forms of flowers on plants of the same species. John Murray. London, UK.
- Delprete, P.G. Rubiaceae. Pp. 328-333. *In*: N. Smith; S.A. Mori; A. Henderson; D. Wm. Stevenson & S.V. Heald. Flowering plants of the neotropics. Princeton and Oxford, New Jersey, The New York Botanical Garden. Princeton University Press. 2004.
- Delprete, G.P. Flora dos estados de Goiás e Tocantins. Coleção Rizzo, Vol. 40, Rubiaceae Parte 1: Introdução, Gêneros A-H, Goiânia - 2010.
- Eduardo, D.F. 2012. Biologia reprodutiva e da polinização de *Faramea multiflora* (L). A Rich. (Rubiaceae). Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.
- Endels, P., Jacquemyn, H., Brys, R. & Hermy, M. 2002. Changes in pin–thrum ratios in population of the heterostyled *Primula vulgaris* Huds: does imbalance affect population persistence? *Flora* 197, 326–331.
- Ferreira, M.C. & Consolaro, H. 2013. Fenologia e síndromes de polinização e dispersão de espécies de sub-bosque em um remanescente florestal urbano no Brasil Central. *Biosci. J.* Uberlândia, 29(1): 1708-1720.
- Ferrero, V. 2014. Heterostilia, ¿qué sabemos hasta el momento? *Ecosistemas* 23(3): 23-30.

- Ferrero, V., Castro, S., Sánchez, J.M. & Navarro, R. 2011. Stigma-anther reciprocity, pollinators, and pollen transfer efficiency in populations of heterostylous species of *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). *Plant Syst. Evol.* 291: 267-276.
- Fournier, L.A. 1974. Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. *Turrialba* 24: 422-423.
- Freitas, C.V. & Oliveira, P.E. 2002. Biología reproductiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica* 25: 311-321.
- Furtado, M.T.R. 2015. A funcionalidade da distilia em *Psychotria nitidula* Cham. & Schltld. (Rubiaceae): o papel do polinizador na transferência de pólen. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília (UnB). 46p.
- Ganders, F.R. 1975. Fecundity in distylous and self-incompatible homostylous plants of *Mitchella repens* (Rubiaceae) *Evolution* 29(1): 186-188.
- Ganders, F.R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607-635.
- García-Robledo, C. 2008. Asymmetry in pollen flow promotes gender specialization in morphs of the distylous neotropical herb *Arcytophyllum lavarum* (Rubiaceae). *Evol Ecol* 22: 743-755.
- Gentry, H.A. 1974. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica* 6, 65-92.
- Gómez, J.M. 2002. Generalización en las interacciones entre plantas y polinizadores. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75: 105-115.
- González, C., Ornelas, J.F. & L. Jiménez. 2005. Between-year changes in functional gender expression of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a distylous, hummingbird-pollinated shrub. *Annals of Botany* 95: 371-378.
- Hamilton, C.W. 1990. Variations on a distylous theme in mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 65-75.
- Heuch, I. 1979. Equilibrium populations of heterostylous plants. *Theoretical Population Biology* 15: 43-57.
- Hernández, A. & Ornelas, J.F. 2007. Disassortative pollen transfer in distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a hummingbird-pollinated shrub. *Écoscience* 14(1): 8-16.

- Johnson, S.D. & Steiner, E. 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends Ecol. Evol.* 15, 140-143.
- Keller, B., Thomson, J.D. & Conti, E. 2014. Heterostyly promotes disassortative pollination and reduces sexual interference in Darwin's primroses: Evidence from experimental studies. *Functional Ecology* 28: 1413–1425.
- Kissling, J. & Barrett, S.C.H. 2013. Variation and evolution of herkogamy in *Exochaenium* (Gentianaceae): implications for the evolution of distily. *Annals of Botany* 112: 95-102.
- Kohn, J.R. & Barrett, S.C.H. 1992. Experimental Studies on the Functional Significance of Heterostyly. *Evolution*, 46(1): 43-55.
- Lau, T.C. & Stephenson, A.G. 1994. Effects of soil phosphorus on pollen production, pollen size, pollen phosphorus content, and ability to sire seeds in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Sexual Plant Reproduction*. 7: 215–220.
- Lau, P. & Bosque, C. 2003. Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae): Na experimental test of the disassortative pollen flow hypothesis. *Oecologia* 135: 593-600.
- Lloyd, D.G. & Webb, C.J. 1992. The evolution of heterostyly. *In*: Barrett, S.C.H. (ed.), *Evolution and function of heterostyly*, pp. 151-178. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- Martén-Rodríguez, S., Muñoz-Gamboa, P., Delgado-Dávila, R. & Quesada, M. 2013. Asymmetric pollen transfer and reproductive success of the hawkmoth-pollinated distylous tree *Palicourea tetragona* (Rubiaceae) at La Selva, Costa Rica. *Journal of Tropical Ecology* 29: 501-510.
- Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technol.* 34: 125–128.
- Maruyama, P.K., Amorim, F.W. & Oliveira, P.E. 2010. Night and day service: Distily and mixed pollination system in *Faramea cyanea* (Rubiaceae). *Flora* 205: 818-824.
- Massinga, P.H., Johnson, S.D. & Harder, L.D. 2005. Heteromorphic incompatibility and efficiency of pollination in two distylous *Pentanisia* species (Rubiaceae). *Annals of Botany* 95: 389–399.
- Matsumura, C. & Washitani, I. 2000. Effects of population size and pollinator limitation on seed-set of *Primula sieboldii* populations in a fragmented landscape. *Ecol. Res.* 15: 307–322.

- Mendonça, R.C., Felfili, J.M., Walter, B.M.T., Silva-Júnior, M.C., Rezende, A.V., Filgueiras, T.S., Nogueira, P.E. & Fagg, C.W. 2008. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. *In* Cerrado: ecologia e flora. (S.M. Sano, S.D.P. Almeida, J.F. Ribeiro, eds.). Embrapa Cerrados/Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, v.2, p.421-1279.
- Muchhala, N., Caiza, A., Vizuete, J.C. & Thomson, J.D. 2009. A generalized pollination system in the tropics: bats, birds and *Aphelandra acanthus*. *Annals of Botany* 103: 1481–1487.
- Oksanen, F.J., Blanchet, G., Kindt, R., Legendre, P., Peter R., Minchin, R.B., O'hara, Gavin L., Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Wagner, H., Vegan: Community Ecology. Package. R package version 2.0-7. 2013.
- Oliveira, P.E. & Gibbs, P.E. Pollination and Reproductive Biology in Cerrado Plant Communities. *In*: Oliveira, P.S.; Marquis, R. J. (Ed.). The Cerrados of Brazil – ecology and natural history of a neotropical savanna. New York: Columbia University Press, 2002. p. 329-347.
- Ollerton, J., Alarcón, R., Waser, N.M., Price, M.V., Watts, S., Cranmer, L., Hingston, A., Peter, C.I. & Rotenberry, J. 2009. A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Ann. Bot.* 103, 1471–1480.
- Ornelas, J.F., Jiménez, L., González, C. & Hernández, A. 2004. Reproductive ecology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in a tropical montane forest. I. Hummingbirds' effectiveness as pollen vectors. *American Journal of Botany*, 91: 1052-1060.
- Pailler, T. & Thompson, J.D. 1997. Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (Rubiaceae) endemic to La Reunion Island. *American Journal of Botany* 84(3): 315-327.
- Pailler, T., Maurice, S. & Thompson, J.D. 2002. Pollen transfer patterns in a distylous plant with overlapping pollen-size distributions. *Oikos* 99: 308-316.
- Pérez-Barrales, R. & Arroyo, J. 2010. Pollinator shifts and the loss of style polymorphism in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae). *J. Evol. Biol.* 23: 1117–1128.
- Radford, A.E., Dickinson, W.C., Massey, J.R., Bell, C.R. 1974. Vascular plant systematics. New York, Harper & Row Publishers, p.891.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, E.S. 1996. *Biologia Vegetal*. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

- Rech, A.R., Avila Jr., R.S. & Schlindwein, C. 2014. Síndromes de polinização: especialização e generalização. In *Biologia da polinização* (Rech, A.R., Agostini, K., Oliveira, P.E., Machado, I.C. org.) Editora Ceres Belchior – Rio de Janeiro. pp 171-181.
- Ree, R.H. 1997. Pollen flow, fecundity, and the adaptive significance of heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Biotropica* 29: 298–308.
- Ribeiro, J.F. & Walter, B.M.T. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: Sano, S.M.; Almeida, S.P.; Ribeiro, J. F. (Ed.). *Cerrado: ecologia e flora*. Brasília: EMBRAPA Informação tecnológica, 2008. 151-212.
- Richards, J.H. & Koptur, S. 1993. Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 80(1): 31-40.
- Rodrigues, E.B. & Consolaro, H. 2013. Atypical distyly in *Psychotria goyazensis* Mull. Arg. (Rubiaceae), an intramorph self-compatible species. *Acta Botanica Brasilica* 27: 155-161.
- Sá, T.F.F. 2013. Sistema distílico e biologia reprodutiva de cinco espécies de *Psychotria* L. (Rubiaceae) em um remanescente de Mata Seca Semidecidual do Sudeste Goiano. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal. 50p.
- Sánchez, J.M., Ferrero, V., Navarro, L. 2013. Quantifying reciprocity in distylous and tristylous plant populations. *Plant Biology* 15: 616-620.
- Sakai, S. & Wright, S.J. 2008. Reproductive Ecology of 21 coexisting *Psychotria* species (Rubiaceae): when is heterostyly lost? *Biological Journal of the Linnean Society* 93: 125-134.
- Sobrevila, C., Ramirez, N. & Enrech, N.X. 1983. Reproductive biology of *Palicourea fendleri* and *P. petiolaris* (Rubiaceae) heterostylous shrubs of a tropical cloud forest in Venezuela. *Biotropica* 15: 161-169.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2008. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. 2. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.
- Stone, J.L. 1995. Pollen donation patterns in a tropical distylous shrub (*Psychotria suerrensensis*; Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82(11): 1390-1398.

- Stone, J.L. & Thomson, J.D. 1994. The evolution of distyly: pollen transfer in artificial flowers. *Evolution* 48: 1595-1606.
- Takebayashi, N., Wolf, D.E., Delph, L.F. 2006. Effect of variation in herkogamy on outcrossing within a population of *Gilia achilleifolia*. *Heredity* 96: 159-165.
- Taylor, C.M. 2008. Rubiacearum Americanarum Magna Hama Pars XX. New Species of *Faramea* (Coussareae) from Central and South America. *Novon* 18: 251–260.
- Teixeira, L.A.G. & Machado, I.C. 2004. Biología da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). *Acta bot. bras.* 18(4): 853-862.
- Travers, S.E. 1999. Environmental effects on components of pollen performance in *Faramea occidentalis* (L.) A. Rich. (Rubiaceae). *Biotropica* 31(1): 159-166.
- Travers, S.E., Gilbert, G.S., Perry, E.F. 1998. The effect of rust infection on reproduction in a tropical tree (*Faramea occidentalis*). *Biotropica* 30(3): 438-443.
- Valois-Cuesta, H. 2008. Diestilia y ecología de la polinización de *Palicourea demissa* Standl. (Rubiaceae) en una selva nublada de Los Andes venezolanos. Trabajo de grado para optar al título de Magister Scientiae en Ecología Tropical. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Valois-Cuesta, H., Soriano, P.J. & Ornelas, J.F. 2011. Asymmetrical legitimate pollination in distylous *Palicourea demissa* (Rubiaceae): the role of nectar production and pollinator visitation. *Journal of Tropical Ecology* 27: 393-404.
- Waser, N.M., Chittka, L., Price, M.V., Williams, N.M. & Ollerton, J. 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, 77: 1043-1060.
- Webb, C.J. & Lloyd, D.G. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. II Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24: 163-178.
- Weller, S.G. 2009. The different forms of flowers – what have we learned since Darwin? *Botanical Journal of the Linnean Society* 160: 249–261.
- Wolff, D., Braun, M. & Liedtke, S. 2003. Nocturnal versus diurnal pollination success in *Isertia laevis* (Rubiaceae): a Sphingophilous plant visited by Hummingbirds. *Plant Biol.* 5: 71-78.

- Wolff, D. & Liede-Schumann, S. 2007. Evolution of flower morphology, pollen dimorphism, and nectar composition in *Arcytophyllum*, a distylous genus of Rubiaceae. *Organisms Diversity and Evolution* 7: 106–123.
- Wu, X., Li, A. & Zhang, D. 2010. Cryptic self-incompatibility and distyly in *Hedyotis acutangula* Champ. (Rubiaceae). *Plant Biology* 12: 484–494.
- Zapata, T.R. & Arroyo, M.T.K. 1978. Plant reproductive ecology of a Secondary Deciduous Tropical Forest in Venezuela. *Biotropica* 10(3): 221-230.
- Zhou, W., Barrett, S.C.H., Wang, H. & Li, D. 2012. Loss of floral polymorphism in heterostylous *Luculia pinceana* (Rubiaceae): a molecular phylogeographic perspective. *Molecular Ecology* 21: 4631-4645.
- Zhou, W., Barrett, S.C.H., Wang, H. & Li, D. 2015. Reciprocal herkogamy promotes disassortative mating in a distylous species with intramorph compatibility. *New Phytologist* 206: 1503-1512.