



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Botânica  
Programa de Pós-Graduação em Botânica

A FUNCIONALIDADE DA DISTILIA EM *PSYCHOTRIA NITIDULA* CHAM. &  
SCHLTDL. (RUBIACEAE): O PAPEL DO POLINIZADOR NA TRANSFERÊNCIA DE  
PÓLEN

MARCO TÚLIO RODRIGUES FURTADO - BOTÂNICA UNB

AGOSTO - 2015

MARCO TÚLIO RODRIGUES FURTADO

A FUNCIONALIDADE DA DISTILIA EM *PSYCHOTRIA NITIDULA* CHAM. &  
SCHLTDL. (RUBIACEAE): O PAPEL DO POLINIZADOR NA TRANSFERÊNCIA DE  
PÓLEN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Botânica da Universidade de Brasília (UnB).

**Orientador: Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro**

Brasília, agosto de 2015

MARCO TÚLIO RODRIGUES FURTADO

A FUNCIONALIDADE DA DISTILIA EM *PSYCHOTRIA NITIDULA* CHAM. &  
SCHLTDL. (RUBIACEAE): O PAPEL DO POLINIZADOR NA TRANSFERÊNCIA DE  
PÓLEN

Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica da Universidade de Brasília - UnB, como parte das exigências do curso de Pós-graduação em Botânica, para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 28 de agosto de 2015

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro  
Universidade Federal de Goiás - UFG (Orientador)

---

Prof. Dra. Luísa Mafalda Gigante Rodrigues Carvalheiro  
Universidade de Brasília - UnB (Membro titular)

---

Prof. Dr. Christiano Peres Coelho  
Universidade Federal de Goiás - UFG (Membro titular)

---

Prof. Dra. Cássia Beatriz Rodrigues Munhoz  
Universidade de Brasília - UnB (Membro suplente)

*“Não creio que nada em minha vida científica tenha me  
dado tanta satisfação como descobrir o significado das  
estruturas dessas plantas”*

The autobiography of Charles Darwin: 1809-1882  
(Collins, London)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos principais responsáveis por mais esta conquista, meus pais, Cleber e Rosilene, e a minha irmã, Thayane Furtado, sem vocês esse sonho não se tornaria possível, muito obrigado pelo apoio, incentivo, subsídio e amor incondicional, vocês são as colunas de toda essa obra. Obrigado minha FAMÍLIA, Amo vocês tantão!!!

Meus agradecimentos ao meu orientador Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro, por sempre ter depositado toda a sua confiança em mim para realização desta dissertação, suas colaborações e sugestões foram imprescindíveis para a construção e elaboração desse estudo.

A minha co-orientadora Prof. Dra. Rócio Perez-Barrales, pelo auxílio no preparo dos testes experimentais a serem realizados no campo, pela a carga teórica e científica transmitida a mim durante todos esses dois anos e pela colaboração nas análises estatísticas!! Obrigado!!

A Prof. Dra. Cássia Beatriz Rodrigues Munhoz, que me recebeu em Brasília e aceitou de pronto atendimento o convite para me orientar por um tempo determinado, este belo gesto proporcionou o início da realização de todo esse trabalho. Obrigado!!! Fica aqui também meus sinceros agradecimentos pela ótima recepção e apoio que você sempre nós deu (a mim e ao Hélder) durante esse período e principalmente pela confiança da realização dessa dissertação.

Aos meus demais familiares que sempre apoiaram e torceram pelos meus sonhos, em especial a memória do meu primo/irmão Fernando Rodrigues Santana do Nascimento, que começou a trilhar esse sonho comigo em 2005 quando iniciamos o Ensino Médio, essa conquista vai pra você meu irmão, esteja você onde estiver, Te amo!!!

A Maxwellen Fernandes, minha ex-namorada, seu apoio, carinho e incentivo foram incomparáveis, sua presença foi fundamental para o encorajamento da busca deste progresso acadêmico, obrigado pela generosidade e companheirismo!! Você é uma pessoa muito especial.

Aos meus Amigos da República BotEco, pelo apoio e abrigo que me proporcionaram durante meu período em Brasília. Daniel Chaves, Caqui (Leonardo Borges), Maxmiller Cardoso, Gustavo Mariano, Arthur de Paula, Ebenézer Rodrigues e Raphael Matias. Nossas discussões sobre os diferentes temas de cada dissertação e tese foi muito enriquecedor para meu crescimento científico. Valeu Galera!!

Aos meus amigos e companheiros de turma que conheci durante esse período, que de alguma forma sempre me proporcionaram alegria. Aldicir Scariot, Daniel Vieira, Gustavo Paiva, Rodrigo Rosa, Helena Lara, Pamela Moser, Letícia Gomes, Aelton Giroldo, Monique Alves, Tamily Rocha, Livia Moura, Raissa Ribeiro, Fernanda Catenacci, Luiz Felipe (Formiga), Natacha Silva.

Gostaria de agradecer em especial meus amigos de laboratório que além de todo o conhecimento científico compartilhado, sempre que possível me auxiliaram nas coletas em campo. Raphael Matias, Túlio de Sá, Danilo Luiz, Anderson Penna, Isabela Gomes, Ebenézer Rodrigues. Obrigado galera, sem a ajuda de vocês a realização e análises dessas coletas não seriam possíveis.

Aos Professores e amigos da Universidade Federal de Goiás, Anderson Ferreira, Ingrid de Mattos e Karla Graziella.

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

Aos Professores do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília!

Aos membros da banca que aceitaram participar desse processo.

Ao Programa de Pós-graduação em Botânica.

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

**SUMÁRIO**

Resumo .....	XI
Abstract .....	XII
1.Apresentação do Tema .....	01
2.Introdução .....	03
3.Objetivos .....	06
3.1.Hipóteses.....	06
4.Material e Métodos .....	07
5.Resultados .....	15
6.Discussão .....	27
7.Referências.....	34
8.Anexo I.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características florais de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltld. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. As letras minúsculas representam comparações entre os morfos dentro da mesma linha, e as letras maiúsculas representam comparações entre a altura dos pistilos/estames entre os morfos. *F* e *p* são os valores da Anova para comparações entre os morfos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os morfos ( $p < 0,05$ ). \* Representam comparações entre a altura do pistilo/estame dentro de cada morfo ( $p < 0,05$ ). Valores: Média  $\pm$  Desvio padrão.....15

Tabela 2. Proficiências da função masculina (doador) e feminina (receptor) ( $T_{ij}$ ) de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltld. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. Protocolo elaborado por Lloyd & Webb (1992). 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 e (E.P.V) emasculado e coletado após primeira visita.....21

Tabela 3. Comparações entre a produção de inflorescências, flores e frutos entre os morfos de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltld. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. Valores: Média  $\pm$  Erro padrão (nível de significância  $p < 0,05$ ).....22

Tabela 4. Número total de visitas e frequência dos visitantes florais de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltld. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor 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 ( $p < 0,05$ ).....25

Tabela 5. Número de grãos de pólen de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltld. (Rubiaceae) presente nas diferentes partes do corpo dos polinizadores no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. *H*= valor do teste de Kruskal-Wallis. Valores: Mediana  $\pm$  IC.....26

Tabela 6. Grãos de pólen de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltld. (Rubiaceae) presente nas diferentes partes do corpo dos polinizadores com distintos tamanhos de probóscide no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. Letras minúsculas representam comparações entre a quantidade de grãos de pólen de cada morfo em cada parte específica do corpo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). \* Representa comparações entre a quantidade de grãos de pólen de apenas um morfo entre as diferentes partes ( $p < 0,05$ ). *H*= valor do teste de Kruskal-Wallis. B: Brevistilo, L: Longistilo. Valores: Mediana  $\pm$  IC.....26

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Abelhas visitantes das flores de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. A (*Epicharis rustica flava*) e B (*Eulema nigrita*): abelhas com probóscide longas. C (*Apis mellifera*) e D (*Augochloropsis* sp.1): abelhas com probóscide curtas. Barra=10mm.....14
- Figura 2. Variação em milímetros na altura dos pistilos (●) e dos estames (□) de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. As flores foram ordenadas de forma crescente pela altura dos pistilos (eixo x) para ilustrar a reciprocidade entre os verticilos reprodutivos em cada morfo.....16
- Figura 3. Flores de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. A. Flor longistila, B. Flor brevistila.....16
- Figura 4. Grãos de pólen de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. A. Grão de pólen do morfo longistilo, B. Grão de pólen do morfo brevistilo.....17
- Figura 5. Distribuição da frequência do tamanho dos grãos de pólen dos morfos florais de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO.....18
- Figura 6. Número de grãos de pólen por estigma em *Psychotria nitidula* Cham. & Schltl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. (A) Quantidade total, (B) quantidade de pólen legítimo e (C) quantidade de pólen ilegítimo. Tratamento: (C) controle, (E.C.F) emasculado e coletado no final do dia e (E.P.V) emasculado e coletado após primeira visita. Valores: Mediana ± IC. No centro do gráfico estão os resultados do Wald  $\chi^2$  para as comparações entre os morfos e entre os tratamentos. As letras minúsculas representam comparações entre os tratamentos dentro de cada morfo (Letras diferentes representam diferenças significativas;  $p < 0,05$ ), os asteriscos representam comparações entre os morfos para tratamentos iguais (\*  $p < 0,05$ ).....20
- Figura 7. Probabilidade de cada morfo receber grãos de pólen legítimos e ilegítimos para cada morfo e tratamento em *Psychotria nitidula* Cham. & Schltl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. (A) Probabilidade de receber pólen legítimo, (B) Probabilidade de receber pólen ilegítimo Tratamento: (C) Controle, (E.C.F) emasculado e coletado no final do dia, (E.P.V) emasculado e coletado após primeira visita. Valores: Mediana ± IC. No centro do gráfico estão os resultados do Wald  $\chi^2$  para as comparações entre os morfos e entre os tratamentos. As letras minúsculas representam comparações entre os tratamentos dentro de cada morfo (Letras diferentes representam diferenças significativas  $p < 0,05$ ), os asteriscos representam comparações entre os morfos para tratamentos iguais (\*  $p < 0,05$ ).....21

Figura 8. Visitantes florais de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. A: *Apis mellifera* (Himenoptera), B: *Partamona rustica* (Himenoptera), C: Lepidoptera.....24

## RESUMO

Os polinizadores desempenham um importante papel na funcionalidade da distília, pois a partir da hercogamia recíproca (HR) que os grãos de pólen são depositados sobre partes específicas do corpo dos polinizadores. O presente trabalho teve como objetivo estudar a funcionalidade da distília no fluxo de pólen e na deposição dos grãos de pólen em partes específicas do corpo dos polinizadores em uma população de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae). A coleta de dados ocorreu na transição de dois anos (2013-14/2014-15) em uma Mata estacional Semidecídua, localizada no Brasil Central. Foram obtidas informações sobre morfometria floral, HR, nível de hercogamia, isopleτία, sistema de incompatibilidade, produção de néctar, dimorfismo polínico, produção e transferência de pólen, produção de inflorescências, flores, frutos e sementes, visitantes florais e suas cargas polínicas. A população apresentou os morfos longistilo e brevistilo em isopleτία e a produção de flores, inflorescência, frutos e sementes foi a mesma para ambos os morfos. Segundo os índices de reciprocidade, a HR foi ausente para ambos os verticilos reprodutivos, porém segundo as análises estatísticas os verticilos baixos apresentaram reciprocidade. Ambos os morfos apresentam separação estigma-antera (hercogamia) sem diferenças na hercogamia entre os morfos. A produção de frutos ocorreu apenas após tratamentos legítimos e a produção de néctar foi semelhante entre os morfos. Os únicos polinizadores que apresentaram deposição de pólen em partes específicas do corpo dos polinizadores foram os de probóscide curta. O principal visitante foi a abelha exótica *Apis mellifera*. O fluxo de pólen intermediado pelos polinizadores foi totalmente assimétrico, no qual o morfo brevistilo foi melhor receptor de pólen legítimo em todos os tratamentos. Alguns fatores básicos podem explicar a assimetria no fluxo de pólen e a não deposição de pólen em partes específicas do corpo dos visitantes de língua longa: a presença de HR dos verticilos baixos possibilitou uma maior eficácia no fluxo de pólen; a atuação ineficiente de um polinizador exótico; a interferência sexual dos verticilos reprodutivos, pois o morfo longistilo desempenhou uma função masculina e o brevistilo uma função feminina. Dessa forma, acredita-se que desvios em caracteres tidos como cruciais para a manutenção e funcionalidade da distília nem sempre afetam o sucesso reprodutivo e favorecem desequilíbrio na razão dos morfos, sobretudo quando o sistema de incompatibilidade é atuante, como encontrado em *P. nitidula*.

**Palavras-chaves:** Heterostília, Polimorfismo floral, Hercogamia recíproca, Polinização, Cerrado.

**ABSTRACT**

Pollinators play an important role in the functionality of distyly, since the reciprocal herkogamy (RH) facilitates the deposition of pollen grains on specific body parts of the pollinators. This study aimed to study the functionality of the distylous system in the pollen flow and in the deposition of pollen grains in specific parts of the body of the pollinators of one population of *Psychotria nitidula* Cham. & Schldl. (Rubiaceae). Data collection occurred in the transition of two followed years (2013-14/2014-15) in a Tropical semideciduous forest in the Central Brazil. Information about the floral morphology, the RH, the herkogamy level, the morph ratio, the incompatibility system, nectar production, the pollen dimorphism, the production and pollen transfer, the amount of inflorescences, flowers, fruits and seeds, the floral visitors and their pollen loads were obtained. The studied population presented the pin and the thrum morphs in isoplethy, the production of flowers, inflorescences, fruits and seeds was the same for both morphs, but the reciprocity indices indicated absent of reciprocal herkogamy between the two floral morphs, although, the statistical results indicated reciprocity between the lower whorls of the flowers. Both morphs presented stigma-anther separation (herkogamy), and, there were no differences in the herkogamy between the floral morphs. There were no differences between the morphs in the nectar production and in the fruit production, that, occurred only by legitimate pollinations. A produção de frutos ocorreu apenas após tratamentos legítimos, e produção de néctar foi semelhante entre os morfos. The only pollinators that presented pollen deposition on specific body parts were the short-tongued visitors. The main visitor was the exotic bee *Apis mellifera*. The pollen flow mediated by pollinators was completely asymmetrical, the thrum morph received more legitimate pollen than the pin morph in all the performed treatments. Some factors may explain the asymmetry in the pollen flow and the non-deposition of pollen in specific parts of the long-tongued visitors. Such as the presence of reciprocal herkogamy of the lower whorls, that could enabled a greater effectiveness in the pollen flow, an ineffective action of an exotic pollinator and the sexual interference in the reproductive structures, since the pin morph pin played a male function and the thrum a female. Therefore, it is believed that deviations in characters, regarded as crucial for the maintenance and function of distyly, not always affect the reproductive success and cause imbalance in morph ratio, particularly when the incompatibility system is active, as found in *P. nitidula*.

**Key words:** Heterostyly, floral polimorphism, Reciprocal herkogamy, Pollination, Cerrado.

## 1. APRESENTAÇÃO DO TEMA

A heterostilia é uma estratégia reprodutiva apresentada por 28 famílias de angiospermas, sendo a diminuição da autopolinização e a busca pela fecundação cruzada as principais explicações evolutivas para a origem desse sistema (Barrett *et al.* 2000). É caracterizada por apresentar populações com duas (distilia) ou três (tristilia) formas florais que se diferem quanto à posição dos estigmas e anteras e também por um sistema genético de autoincompatibilidade, no qual através de um reconhecimento bioquímico do pistilo-pólen, os tubos polínicos se desenvolvem apenas após polinizações legítimas (chamada de polinizações intermorfos) (Ganders 1979, Bawa & Beach 1983, Konh & Barrett 2012).

A distilia é a forma mais comum da heterostilia, sendo encontrada em 26 das 28 famílias heterostílicas (Barrett *et al.* 2000). É caracterizada por apresentar flores que apresentam estiletos curtos e estames longos (morfo brevistilo) e flores que apresentam estiletos longos e estames curtos (morfo longistilo). Cada indivíduo apresenta um tipo floral, sendo que em populações em equilíbrio é esperado uma razão equilibrada dos morfos dentro das populações (isoplezia 1:1) (Bahadur 1968, Ganders 1979, Barrett 1992). A isoplezia se dá devido ao fato do morfo brevistilo se manifestar na forma heterozigota e o longistilo na homozigota recessiva, sendo a homozigota dominante uma forma deletéria (Ganders 1979). As características genéticas e morfológicas mencionadas acima parecem ser gerenciadas por meio de uma forte associação entre os *loci* gênicos que os controlam, formando o que é chamado de “Supergene” (Ganders 1979), contudo esse conceito é genérico e não foi esclarecido para algumas famílias distílicas, dentre elas Rubiaceae (Consolaro *et al.* 2011, Rodrigues & Consolaro 2013).

A família Rubiaceae é a quarta maior dentre as angiospermas, sendo representada por cerca de 650 gêneros e 12000 espécies (Delprete *et al.* 2004). No Brasil, é considerada uma das famílias mais importantes, possuindo 130 gêneros e 1500 espécies (Sousa & Lorenzi 2005). No Cerrado, são encontrados cerca de 376 espécies distribuídas em todas as fitofisionomias, sendo considerada a sétima mais rica do bioma (Mendonça *et al.* 2008). Dentre as 26 famílias com distilia, Rubiaceae é considerada a mais rica, pois é a que possui mais gêneros distílicos (Ganders 1979, Barrett *et al.* 2000). Essa família está subdividida em três subfamílias monofiléticas, Ixoreae, Cinchonoideae e Rubioideae, de modo que em Rubioideae a distilia é, majoritariamente, presente (Faivre & McDade 2001, Bremer & Eriksson 2009, Ferrero *et al.* 2012). O gênero *Psychotria* está inserido em Rubioideae, possuindo em torno de 2000 espécies que estão distribuídas nos trópicos e subtropicais, sendo-

as comumente representado por arbustos, ervas e epífitas (Robbrecht 1988). Suas flores são pequenas, geralmente, polinizadas por abelhas, moscas, mariposas e aves (Hamilton 1990). É um dos maiores gêneros dentre as angiospermas e, provavelmente, o maior táxon distílico (Davis *et al.* 2001). Na tribo Psychotreae, no qual o referido gênero está inserido, a distilia é uma característica primitiva e, taxonomicamente, difundida, portanto a presença de outros sistemas reprodutivos no gênero sempre é atribuído a alguma variação evolutiva do polimorfismo (Hamilton 1990).

Estudos com espécies da família Rubiaceae têm demonstrado que a distilia se manifesta tipicamente em vários gêneros, como em *Psychotria*, *Declieuxia*, *Faramea*, *Palicourea*, *Rudgea* e *Manettia*, entretanto outros trabalhos mostram variações em representantes desses gêneros, principalmente em *Psychotria* (Consolaro 2008, Consolaro *et al.* 2011, Rodrigues & Consolaro 2013) (Anexo I). Os estudos que encontraram variações no regimento deste polimorfismo, como o monomorfismo, discutem que tais alterações ocorrem por meio de uma possível falha na transferência de pólen legítimo, possivelmente, devido à falta de hercogamia recíproca (HR) entre os morfos e por um serviço de polinização ineficiente. Contudo, essas discussões são meramente especulativas, uma vez que os trabalhos não investigaram, diretamente, a funcionalidade da distilia a partir da atuação dos polinizadores e da existência de um fluxo de pólen legítimo intermediado pela HR. A presente dissertação contribuirá, justamente, para preencher essa lacuna, pois investigará os possíveis processos ecológicos e funcionais envolvidos na heterostilia, tais como traços florais, HR e o serviço de polinização. Para isso, foi utilizada *Psychotria nitidula* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae), uma espécie subarbustiva encontrada no sub-bosque de formações florestais de Cerrado. Uma população desta espécie já vem sendo estudada desde 2009, no qual informações de fenologia, biologia floral, sistema de incompatibilidade, razão dos morfos florais, recurso oferecido aos polinizadores, morfometria floral e polinizadores, já foram coletadas e o manuscrito está em fase final de submissão.

## 2. INTRODUÇÃO

Um dos modelos evolutivos que tentam explicar a origem da heterostilia prediz que a distinção morfológica das flores é pioneira ao sistema de incompatibilidade e também argumenta que a hercogamia recíproca (altura dos estames de um morfo na mesma da altura do estigma do morfo oposto) surgiu como forma de potencializar o fluxo de pólen intermorfo (Lloyd & Webb 1992). Darwin (1877) elaborou uma hipótese para esse sistema e destacou a importância dos polinizadores na funcionalidade da distília, pois a partir da hercogamia recíproca (HR) que os grãos de pólen seriam depositados sobre partes específicas do corpo dos polinizadores, o que aumentaria as chances de polinização legítima e reduziria a interferência entre os estames (doador de pólen) e pistilo (receptor do pólen) dentro de cada morfo (Darwin 1877, Lloyd & Webb 1992). A HR é tida como um fator importante na manutenção evolutiva da distília, pois a correspondência na altura dos verticilos reprodutivos pode determinar diferentes taxas de polinizações legítimas (intermorfo) (Hodgins & Barrett 2006). Alguns autores como Consolaro (2008), Sampson & Krebs (2012) e Sá (2013) encontraram variações nos graus de HR em espécies distílicas e estes discutem que a falta de precisão nessa arquitetura nem sempre afeta o fluxo de pólen e a isopletia. Entretanto, a partir do momento em que à falta de reciprocidade entre os verticilos reprodutivos interferir, diretamente, no fluxo de pólen legítimo, esta então é tida como um fator que pode favorecer uma possível alteração no sistema reprodutivo (Consolaro 2008). Uma vez que muitas espécies distílicas apresentam corola tubulosa e estames epipétalos, o tamanho da corola também é um fator que pode influenciar na HR, de maneira que variações no comprimento do tubo da corola podem interferir no fluxo de pólen legítimo e, assim, atuarem como uma força mediadora ao sistema distílico (Ferrero *et al.* 2009).

O serviço de polinização em espécies distílicas funciona em conjunto com o grau de reciprocidade entre os morfos, sendo que em populações que apresentam uma alta HR espera-se que os polinizadores atuem de forma mais eficiente no fluxo de pólen legítimo e trabalhem como condutores na manutenção do polimorfismo (Ferrero *et al.* 2011a). O número de visitas de cada tipo de polinizador pode variar em relação às diferentes características dos traços florais, tais como coloração, tamanho das flores, produção de néctar e, no caso específico de espécies heterostílicas, por morfo floral (Stanton 1987, Conner & Rush 1996, Mitchell 1994, Husband & Barrett 1992). As características florais desempenham um papel importante nos padrões de busca de recurso pelos polinizadores, uma vez que fornecem

informações que são utilizadas para o reconhecimento do tipo de recurso ofertado, influenciando diretamente no comportamento dos polinizadores (Chittka *et al.* 1999, Glaetli & Barrett 2008, Sapir 2009). Diferenças encontradas entre as arquiteturas florais dos morfos brevistilo e longistilo, como a disposição dos verticilos e tamanho da flor, podem afetar o padrão de visitação dos polinizadores (Husband & Barrett 1992). Grãos de pólen com tamanhos distintos, tamanho das papilas estigmáticas, escultura da exina, produção diferenciada de pólen, são exemplos de outras características acessórias que podem variar entre os morfos florais e, conseqüentemente, influenciar na taxa de visitação (Massinga *et al.* 2005), porém essa real interferência ainda não é muito clara.

A interferência sexual entre as funções masculinas e femininas dentro de uma flor pode ser reduzida pela separação estigma-antera (hercogamia), pois ela reduz a autofecundação e promove a transferência eficiente de pólen (Kohn & Barrett 1992, Cesaro *et al.* 2004). Em espécies distílicas, o valor funcional desse tipo de hercogamia está relacionada diretamente a populações autoincompatíveis pois ela interfere nos níveis de transferência de pólen (função masculina) favorecendo diretamente a atuação dos polinizadores (Ganders 1979, Lloyd & Webb, 1992, Hernández-Ramirez 2012, Coelho 2013). Assim, a separação estigma-antera pode afetar diretamente a polinização em espécies distílicas (Barrett & Shore 1987), devido a interferência na retirada e/ou deposição de pólen pelos polinizadores.

A funcionalidade de cada morfo é definida a partir da sua capacidade de doar e receber grãos de pólen, sendo esperados que ambos contribuam na mesma proporção para que não haja um sucesso reprodutivo desequilibrado e os morfos não atuem como flores, funcionalmente, masculinas ou femininas (Lloyd 1980). Fatores intrínsecos da espécie como número de flores produzidas por indivíduo, anteras, óvulos, sementes e produção de grãos de pólen por flor podem definir a função sexual nas plantas (García-Robledo 2008). Entretanto, fatores ecológicos, como um serviço de polinização ineficiente, pode favorecer que um dos morfos desempenhe mais sua função de doador de pólen do que de receptor e isso favoreça uma especialização sexual do morfo, sendo este um dos mecanismos envolvidos na evolução de variações reprodutivas (Lloyd & Webb 1992).

O fluxo de pólen simétrico entre os morfos longistilo e brevistilo é esperado, pois a HR e a isopleia permitem uma disponibilidade igualitária de cada morfo doar e receber pólen. Contudo, alguns estudos desenvolvidos com espécies heterostílicas demonstram que nem sempre isso ocorre. García-Robledo (2008) notou em *Arcytophyllum lavarum* K. Schum. ex Standl. (Rubiaceae) uma assimetria no fluxo de pólen, no qual o morfo longistilo foi mais eficiente na doação de pólen legítimo com o morfo brevistilo produzindo duas vezes mais

sementes do que o longistilo. Lau & Bosque (2003), analisando o fluxo de pólen em *Palicourea fendleri* Standl. (Rubiaceae), também encontraram que o morfo brevistilo recebeu mais pólen legítimo do que o longistilo, o que segundo esses autores, ocorreu devido a uma maior reciprocidade entre os verticilos baixos (anteras do morfo longistilo com o estigma do morfo brevistilo). Stone (1995) encontrou em *Psychotria suerrensis* (Donn. Sm.) um resultado parecido, onde a polinização legítima entre anteras do morfo longistilo com estigma do morfo brevistilo foi maior que a ilegítima (auto e intramorfo polinização), enquanto as anteras do morfo brevistilo forneceu pólen na mesma quantidade para polinização legítima e ilegítima. Em 1997, Ree observou que a carga de pólen presente em ambos os morfos florais de *Palicourea padifolia* (Humb. & Bonpl. ex Schult.) C.M. Taylor & Lorence (Rubiaceae) foi semelhante, contudo os estigmas do morfo longistilo apresentaram mais grãos de pólen oriundos de polinização legítima, o que resultou em uma maior produção de sementes.

Uma interpretação mais ampla dos possíveis processos ecológicos e funcionais envolvidos na heterostilia, como por exemplo a existência do fluxo de pólen legítimo intermediado pela HR e pela atuação dos polinizadores, é de extrema importância para esclarecer a real eficácia da funcionalidade da distilia. Trabalhos de biologia reprodutiva com espécies distílicas em populações de diferentes espécies e regiões são comuns e importantes, entretanto são meramente descritivos, o que não permitem dimensionar a funcionalidade do sistema. Dessa forma, estudos que investigam como os polinizadores afetam a reprodução sexual e conseguem, de certo modo, dimensionar o seu papel na evolução de um sistema reprodutivo são fundamentais.

### 3. OBJETIVO GERAL

O objetivo desta dissertação foi estudar a funcionalidade da distília no fluxo de pólen e na deposição dos grãos de pólen em partes específicas do corpo dos polinizadores em uma população de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae).

#### 3.1. HIPÓTESES

- 1) O fluxo de pólen legítimo é maior do que o fluxo ilegítimo, independentemente do morfo.
- 2) O fluxo de pólen legítimo é equilibrado entre os morfos, com ambos doando e recebendo pólen em quantidades semelhantes.
- 3) Verticilos reprodutivos recíprocos recebem uma maior quantidade de pólen legítimo do que verticilos não recíprocos.
- 4) A separação estigma-antera (hercogamia) é semelhante entre os morfos florais.
- 5) Polinizadores e/ou grupos mais especializados, como abelhas de probóscide de distintos tamanhos, carregam pólen dos diferentes morfos em partes específicas do corpo.
- 6) Os morfos florais são visitados na mesma frequência na população.
- 7) Os morfos florais estão presentes em uma razão equilibrada na população (isopleτία).
- 8) A produção de inflorescências, flores, frutos e sementes é semelhante entre os morfos.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

*Área e espécie estudada* - O trabalho foi realizado na cidade de Catalão, GO, especificamente, na reserva municipal “Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz” (18°9'36.595"S e 47°55'33.989"W). A reserva possuiu, aproximadamente, 28.48 ha, sendo sua vegetação composta por Mata de Galeria e Mata estacional Semidecídua (*sensu* Ribeiro & Walter 2008). Esta área encontra-se no perímetro urbano de Catalão, possui uma média pluviométrica anual de 1522 mm com 88% das chuvas ocorrendo entre os meses de outubro a março e uma temperatura média anual de 23°C (Vieira *et al.* 2012). O clima da região é do tipo AW (classificação de Köppen 1948), com duas estações bem definidas, seca de maio a setembro, e chuvosa de outubro a abril. A coleta de dados ocorreu em dois períodos de floração, sendo eles entre novembro e fevereiro de 2013/2014 e 2014/2015.

*Psychotria nitidula* é uma espécie com indivíduos subarbustivos com alturas entre 1,0 - 2,5 m e inflorescências terminais cimosas. O cálice é gamossépalo, pentâmero e esverdeado. A corola é tubular, gamopétala, actinomorfas, pentâmera e alva. A flor é andrógina com os verticilos altos de ambos os morfos exsertos, mas dispostos de maneira diferente dos baixos. Para os altos, os estames do morfo brevistilo são dispostos de forma agregada na porção superior a entrada da corola e o pistilo do morfo oposto se encontra no ponto central do tubo, mas, eventualmente, se desloca para a região correspondente aos estames brevistilos. Para os inferiores, os estames do morfo longistilo são dispostos de forma circular ao eixo da corola e o pistilo brevistilo se encontra no ponto central do tubo (*sensu* Sá *et al.*, trabalho em fase final de submissão).

*Morfometria floral, reciprocidade, nível de hercogamia e isopleitia* - Com intuito de averiguar se os morfos apresentam diferenças nas características florais, foram coletadas 30 flores de cada morfo, sendo uma flor por indivíduo. As flores foram coletadas em indivíduos localizados em transectos amostrais não lineares de comprimento distintos com uma margem de cinco metros tanto para a esquerda quanto para a direita. Foi estabelecido um limite mínimo de dois metros de distância entre um indivíduo e outro para evitar pseudoréplica, uma vez que já foi constatado reprodução vegetativa em algumas espécies subarbustivas de *Psychotria* (obs. pess). As medidas foram tiradas de flores fixadas em álcool 70%.

As medidas foram realizadas a partir de fotografias das flores com auxílio do analisador de imagem ImageJ. As características florais mensuradas foram o comprimento do tubo da corola (da base corola até a separação das pétalas), comprimento do estilete (da base

do estilete até a base do estigma), comprimento de cada antera (da base antera até seu ápice), comprimento dos lóbulos estigmáticos (da base do estigma até o seu ápice) e a altura dos estames (da base do filete até o meio da antera). A altura do pistilo foi calculada com base na soma do comprimento do estilete mais o comprimento dos lobos estigmáticos/2. Tal cálculo foi necessário para evitar a superestimação da altura do estigma, pois o estigma é bifido e em condições naturais se encontra aberto. Após testar os pressupostos de normalidade, foi realizado uma ANOVA de um fator para comparar as características florais entre os morfos e dentre os morfos, especificamente, para averiguar a hercogamia em cada morfo (SPSS 22.0).

A HR foi calculada a partir do Índice de Sanchez *et al.* (2013) e de Richards e Koptur (1993). O primeiro índice 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>. O Índice Richards e Koptur (1993) fornece dois valores, sendo um para a reciprocidade dos verticilos altos e outro para os baixos, permitindo averiguar se ambos os morfos apresentam valores semelhantes de reciprocidade. O cálculo é feito da seguinte forma: altura dos estigmas de um morfo menos a altura das anteras do morfo oposto, dividido pela altura das anteras de um morfo mais a altura dos estigmas do morfo oposto. Em espécies com HR, o índice utiliza o valor de 0,0 como faixa de perfeição, porém números entre 0,05 e -0,05 ainda são aceitáveis.

Para averiguar a hercogamia entre altura dos pistilos e dos estames das flores de cada morfo foi utilizado a metodologia proposta por Faivre & McDade (2001), no qual é calculado pela subtração entre a altura das pistilos altos com os estames baixos e a altura dos estames altos com a altura dos estigmas baixos, sempre obtendo valores positivos. Para averiguar diferença entre os morfos, foi realizado um teste não paramétrico do tipo Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

A isoplezia da presente população já tinha sido realizada por Sá *et al.* (trabalho em fase final de submissão), porém o procedimento foi repetido com a finalidade de aumentar o número de indivíduos amostrados e confirmar a condição isoplética. Para averiguar a presença de isoplezia foi executado o método de varredura ao longo das linhas amostrais utilizadas na morfometria floral, sendo os indivíduos morfotipados segundo seu tipo floral (Consolaro *et al.* 2009, Consolaro *et al.* 2011). Devido os dados serem oriundos de contagem, estes foram

assumidos em uma distribuição de Poisson, sendo possível analisar a frequência dos morfos florais na população a partir de um modelo linear generalizado (SPSS 22.0).

*Sistema de incompatibilidade e produção de néctar* - A incompatibilidade foi averiguada a partir de experimentos de polinizações manuais realizadas em 387 flores de 26 indivíduos. Botões em pré-antese foram ensacados com sacos de organza para evitar o contato das flores com seus polinizadores naturais. No dia da antese, foram realizados os seguintes tratamentos, autopolinização manual (N=58), polinização cruzada intramorfo (N=50) e intermorfo (N=79) (Bawa & Beach, 1983). O desenvolvimento inicial dos frutos foi considerado como sucesso de polinização em todos os tratamentos. Para averiguar a autoincompatibilidade, foi utilizado o IAI (Índice de Autoincompatibilidade) que é determinado pela razão entre a proporção da produção de frutos por autopolinização e por polinização cruzada intermorfo (Bullock 1985).

A concentração de açúcar, o volume total de néctar e a quantidade total de açúcar foram medidos, separadamente, em ambos os morfos a partir de 20 flores de cada morfo distribuídos em nove indivíduos. Para essas mensurações, botões foram ensacados em pré-antese para evitar o contato com seus polinizadores. O volume foi medido com auxílio de um capilar micrometrado de 10  $\mu$ l, a concentração de açúcares com refratômetro de mão e a quantidade total de açúcar pelo protocolo descrito em Galetto & Bernardello (2005). As medidas foram tomadas ao final do dia, antes do fim da longevidade da flor. A análise e a comparação dos dados entre os morfos foram feitas através do teste U (Mann-Whitney) (SPSS 22.0).

*Dimorfismo polínico* - Os grãos de pólen dos morfos de *P. nitidula* possuem o formato esférico sem diferenciação na forma da exina, de maneira que o dimorfismo polínico foi caracterizado por meio do seu diâmetro. Para isto, ramos contendo botões florais (30 ramos por morfo, um ramo por indivíduo) foram coletados e inseridos em frascos contendo água destilada, permitindo assim a abertura das flores em laboratório. A partir de cada ramo coletado, foi utilizada uma flor, uma antera por flor e 10 grãos de pólen, totalizando 300 grãos por morfo. As anteras foram maceradas em lâmina com gel de fuxina e tiradas fotos digitais utilizando câmera acoplada ao microscópio. Foi utilizado o teste *t* (SPSS 22.0) para verificar a existência de dimorfismo no diâmetro dos grãos de pólen entre os morfos florais (dados transformados em log para normalidade).

Os grãos de pólen, após a averiguação do dimorfismo polínico, foram alocados em classes de tamanho a fim de organizá-los em uma distribuição de frequência. A partir da

distribuição, foram observadas 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-Rabledo (2008) utilizou a sobreposição máxima de 32% para atribuir uma classe de tamanho ao morfo longistilo ou brevistilo. O presente estudo adotou 20%, pois foram observadas apenas três classes de sobreposição. Classes que continham grãos com sobreposição acima desse valor não entraram na amostragem.

*Produção e transferência de pólen* - A produção total de pólen em cada morfo floral foi avaliada a partir de botões coletados e fixados em álcool 70%. Sua estimativa foi a partir de 20 indivíduos de cada morfo, de modo que foi coletado um botão por indivíduo e uma antera por flor. Neste procedimento, as anteras foram maceradas em uma lâmina e aplicada uma gota de glicerol/carmim. Posteriormente, este material foi levado ao microscópio para a contagem dos grãos, sendo auxiliada pelo analisador de imagem ImageJ. Para calcular o número total de pólen por flor, o número de grãos de pólen produzido por uma antera foi multiplicado pelo número total de anteras na flor (Kearns & Inouye 1993), no caso cinco para *P. nitidula*. Para averiguar se houve diferença na produção total de pólen entre os morfos foi aplicado o teste *t* (SPSS 22.0).

A transferência de pólen entre os morfos foi analisada em estigmas coletados e observados em laboratório. Uma vez que é possível identificar a qual morfo pertence determinado grão, os grãos de pólen depositados sobre a superfície estigmática foram qualificados e quantificados. Foram selecionadas seis parcelas com diâmetro de 10 metros, onde estavam presentes indivíduos de ambos os morfos florais. Foi estabelecida uma distância de cerca de 20 a 30 m entre uma parcela e outra, tomando o cuidado para que elas não estivessem próximas a borda do parque. O número de flores doadoras de pólen nas parcelas foi, propositalmente, equivalente para que ambos os morfos possuíssem a mesma probabilidade de receber grãos de pólen proveniente das flores vizinhas.

Para cada morfo, a eficiência dos polinizadores foi avaliada a partir de três tratamentos em cada parcela: flores emasculadas e coletadas após a primeira visita (EPV); emasculadas e coletadas próximas ao final da longevidade (ECF); controle (C). Foram coletados entre cinco e 10 pistilos em cada tratamento que, logo após a coleta, foram acoplados em placa de petri com gel fuxina. As flores tratadas foram oriundas de botões florais ensacados com sacos de organza no período de pré-antese, pois evita-se o contato com os polinizadores naturais antes do início do experimento.

A variação de fluxo de pólen legítimo entre os morfos e entre os tratamentos foi analisado por meio de modelos lineares generalizados (GLM). Para avaliar qual a probabilidade de grãos de pólen serem transferidos entre os diferentes morfos, os dados foram convertidos em presença e ausência, assumindo uma distribuição binomial. Já para averiguar a quantidade de pólen depositado sobre a superfície estigmática, foi utilizado apenas informações de estigmas onde houve deposição de pólen, sendo os dados analisados assumindo a distribuição de Poisson. Os fatores incluídos nos modelos foram morfo e tratamentos, com a variável resposta sendo o tipo de pólen (brevistilo e longistilo). Após a confirmação da interação entre os fatores a partir dos (GLMs), foi realizado um teste *a posteriori* par a par (Least Significant Difference) com intuito de verificar as diferenças significativas entre os morfos e os tratamentos. Todas as análises foram realizadas no software SPSS 22.0.

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

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

Onde  $T_{ij}$  é a probabilidade de um único grão de pólen do tipo “i” ser transferido para o estigma do tipo “j”,  $(\bar{x} \text{ pólen sobre o estigma})_{ij}$  é o número médio de grãos de pólen “i” sobre cada estigma “j” e o “i” e o “j” representam ambos os morfos. O protocolo não fornece intervalos de valores que expressam mais uma função do que outra (e.g. valores de 0 a 1). Os valores gerados pela fórmula poderão, simplesmente, ser comparados para estimar as funções masculina e feminina, tanto entre morfos quanto entre tratamentos.

*Produção de inflorescências, flores, frutos e sementes* - Foram marcados 20 indivíduos de cada morfo, no qual foi contabilizado o número total de inflorescências por indivíduo. Estes dados foram coletados durante o pico de floração da espécie (*sensu* Sá *et al.*, trabalho em fase final de submissão). O número médio de flores por inflorescência foi estimado a partir das cicatrizes deixadas pelas flores senescentes, pelas flores abertas e pelos primórdios de botão floral (cinco inflorescências por indivíduo). Para estimar a quantidade de flores produzidas por indivíduo em cada morfo, o número médio de flores por inflorescência foi multiplicado pelo número total de inflorescências encontradas em cada indivíduo.

Foi calculado o investimento reprodutivo de cada morfo. Para isso, a produção relativa de frutos por inflorescência foi estimada a partir da razão da produção média de frutos por inflorescência pelo número médio de flores por inflorescência, multiplicado por 100 (cinco inflorescências por indivíduo). Para estimar o número total de frutos produzidos por planta, o número médio de frutos produzidos por inflorescência foi multiplicado pelo número total de inflorescências encontradas em cada indivíduo. Vale ressaltar que todas as análises foram desenvolvidas no pico da floração ou frutificação. A partir desses resultados, foi aplicado o teste *t* para analisar se os morfos florais diferiam, estatisticamente, quanto à produção de inflorescências, flores, frutos e total de flores e frutos por indivíduo. Quando necessário, os dados foram transformados em raiz quadrada com intuito de obter a normalidade dos mesmos.

Para analisar a produção relativa de sementes e óvulos produzidos por flor e morfo, foram coletados ao acaso duas flores e dois frutos por indivíduo (20 flores por morfo). Foi contabilizado o número de sementes produzidas por frutos e a sua condição de viabilidade (tamanho reduzido e forma irregular) e inviabilidade (tamanho e forma sem presença de endosperma) (Valois-Cuesta 2008). Para quantificar o número de óvulos produzidos, flores foram levadas ao laboratório e realizados cortes no ovário. A comparação entre tais produções entre os morfos florais foi feita a partir do teste de Poisson (SPSS 22.0). A proporção de sementes formadas foi calculada a partir da razão da produção de sementes por morfo pelo número de óvulos produzidos por morfo, multiplicado por 100. Esse mesmo cálculo foi realizado para cada morfo.

*Visitantes florais e carga polínica* - A observação dos visitantes florais foi realizada diretamente no campo, totalizando 30 horas em 15 indivíduos de cada morfo. Os indivíduos observados foram escolhidos a partir do número significativo de flores abertas durante o período de observação. A quantificação dos visitantes foi realizada a partir de duas sessões de 30 minutos para cada indivíduo com um intervalo de 30 minutos entre uma sessão e outra. Tais dados foram coletados durante o período de maior atividade dos polinizadores, entre 09:00 e 14:00 hrs (*sensu* Sá *et al.*, trabalho em fase final de submissão). Os visitantes foram classificados conforme o seu comportamento durante as visitas, como polinizador (quando contactava o corpo com os verticilos reprodutivos) e pilhador (quando coletava o recurso sem contactar os verticilos reprodutivos). Durante as visitas os polinizadores foram coletados e fotografados e a sua frequência foi registrada. Para comparar o número total das visitas entre os morfos e se cada tipo específico de polinizador apresentava preferência por um deles, foi utilizado modelos lineares generalizados assumindo a distribuição de Poisson (SPSS 22.0).

Abelhas polinizadoras foram coletadas para quantificar a carga polínica presente nas diferentes regiões do corpo. Os indivíduos coletados foram congelados e, posteriormente, em laboratório, descongelados para estimar a carga polínica. Os grãos foram retirados com auxílio de cubos de gelatina glicerinados de Kisser (Kearns & Inouye 1993), sendo-os categorizados de qual parte do corpo estavam sendo retirados: cabeça, tórax, abdômen e probóscide. Juntamente a essa identificação, foi quantificado os grãos provenientes do morfo brevistilo e longistilo. Na mesma área onde o trabalho foi realizado há registro de outras espécies de *Psychotria*, porém apresentam grãos com diâmetro inferior as classes encontradas em *P. nitidula* (obs. pess.), possuem polinizadores distintos (*sensu* Sá *et al.*, trabalho em fase final de submissão) e possuem baixa sobreposição de floração (Sá 2013). Os grãos de pólen que apresentavam morfologia da exina muito distinta de *P. nitidula* foram desconsiderados na amostragem. Para analisar se os polinizadores transportavam grãos de pólen de cada morfo em regiões específicas do corpo, foi realizado uma ANOVA não-paramétrica (Kruskal-Wallis). Essas mesmas análises foram realizadas para abelhas com diferentes tamanhos de probóscide, sendo-as classificadas conforme o tamanho da sua língua em relação ao comprimento do tubo da corola até o nectário floral. Quando a distância da proboscídea foi 0,5 milímetros entre o final da língua e o nectário floral, o polinizador foi considerado como um polinizador de proboscíde curta, caso contrário ele foi classificado como polinizador de proboscíde longa (Santos-Gally *et al.* 2013) (Fig. 1). A partir dessa classificação, foi possível estimar a eficiência na deposição de pólen de cada grupo de polinizador.

A partir do resultado da ANOVA, foi realizado o teste *a posteriori* do tipo Student-Newman-Keuls (SPSS 22.0), com intuito de verificar em qual região havia diferença na carga polínica. Também foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para averiguar se abelhas com diferentes tamanhos de probóscide transportavam diferentes quantidades de grãos de pólen de cada morfo floral, sem a distinção das partes específicas do corpo dos polinizadores (SPSS 22.0).

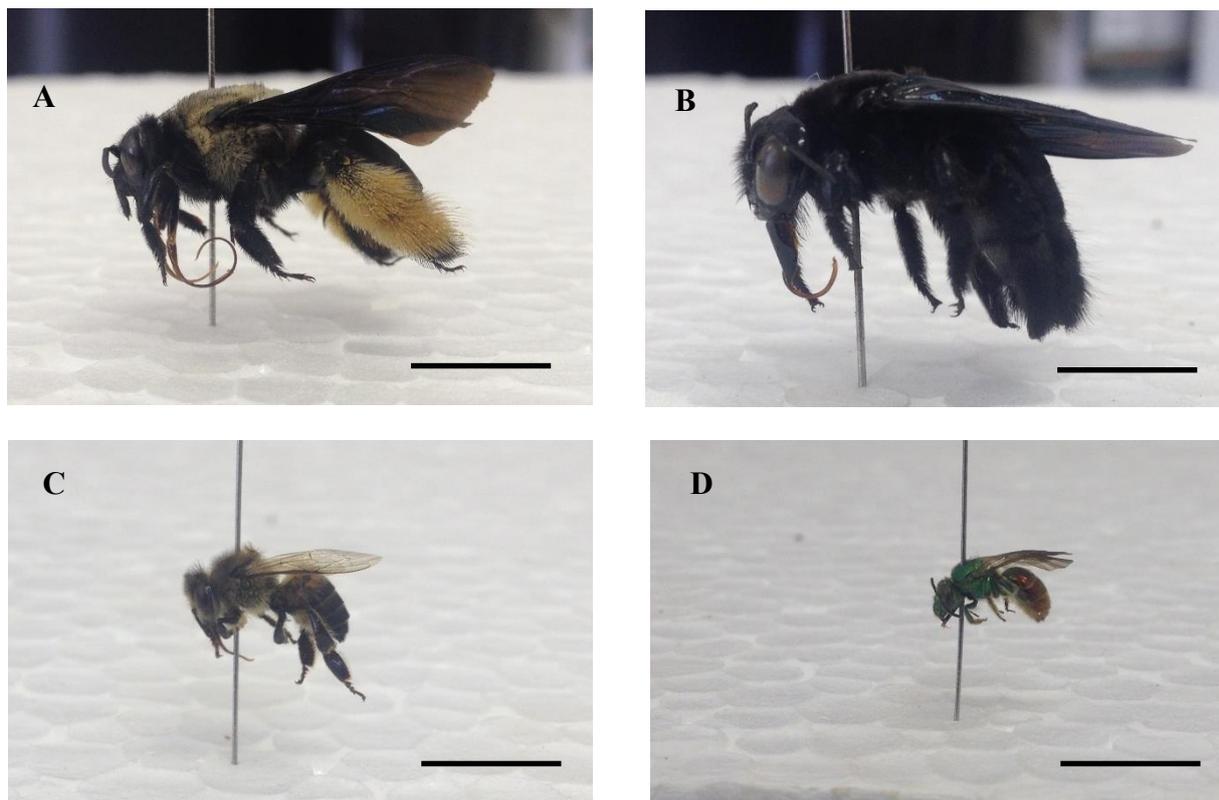


Figura 1. Abelhas visitantes das flores de *Psychotria nitidula* Cham. & Schldtl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. A (*Epicharis rustica flava*) e B (*Eulema nigrata*): abelhas com probóscide longas. C (*Apis mellifera*) e D (*Augochloropsis* sp.1): abelhas com proboscíde curtas. Barra=10mm.

## 5. RESULTADOS

*Morfometria floral, reciprocidade, nível de hercogamia e isopleitia* - Foi encontrada separação estigma-antera (hercogamia) na flores de cada morfo, pois a altura do pistilo foi, significativamente, diferente dos estames (Tab. 1, Fig. 2). A altura dos estames de ambos os morfos apresentou diferença entre eles, o mesmo ocorreu com a altura do pistilo (Tab. 1). O comprimento da corola, antera e do lobo estigmático não diferiram, estatisticamente, entre os morfos florais (Tab. 1).

A HR dos verticilos reprodutivos foi diferente entre os morfos. Quando a reciprocidade foi analisada pelos índices, foi encontrado um valor de  $R_2 = 0,83$  para o Índice de Sánchez (2013),  $R^* = 0,15$  para os verticilos altos e  $R^* = 0,11$  para os baixos, considerando o Índice de Richards & Koptur (1993). A partir das análises estatísticas, os desvios demonstrados pelos índices se mostraram mais destacados, pois foi encontrada diferença na altura dos verticilos altos e não na altura dos baixos (Tab. 1, Fig. 2). Não houve diferença na hercogamia entre os morfos florais, longistilo ( $2,33 \pm 0,54$ ), e brevistilo ( $2,51 \pm 0,55$ ) ( $p < 0,2226$ ;  $H = 1,4878$ ).

Foram encontrados 135 indivíduos de *P. nitidula* na população de estudo, sendo 72 brevistilos e 63 longistilos (Fig. 3). A isopleitia foi constatada na população ( $p = 0,4396$ ;  $Z = 0,7729$ ).

Tabela 1. Características florais de *Psychotria nitidula* Cham. & Schldl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. As letras minúsculas representam comparações entre os morfos dentro da mesma linha, e as letras maiúsculas representam comparações entre a altura dos pistilos/estames entre os morfos (reciprocidade). *F* e *p* são os valores da Anova para comparações entre dentro os morfos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os morfos ( $p < 0,05$ ). \* Representam comparações entre a altura do pistilo/estame dentro de cada morfo ( $p < 0,05$ ). Valores: Média  $\pm$  Desvio padrão.

Traços Florais	Morfortipo floral		<i>F</i>	<i>p</i>
	Brevistilo	Longistilo		
Comprimento da corola	6,48 $\pm$ 0,64a	6,29 $\pm$ 0,60a	200,36	<0,05
Comprimento da antera	2,43 $\pm$ 0,15a	2,32 $\pm$ 0,16a		
Lobo estigmático	1,73 $\pm$ 0,22a	1,44 $\pm$ 0,19a		
Altura do pistilo	4,74 $\pm$ 0,53a,A*	7,85 $\pm$ 0,66b,B*		
Altura do estame	8,46 $\pm$ 0,82a,C	4,36 $\pm$ 0,54b,A		

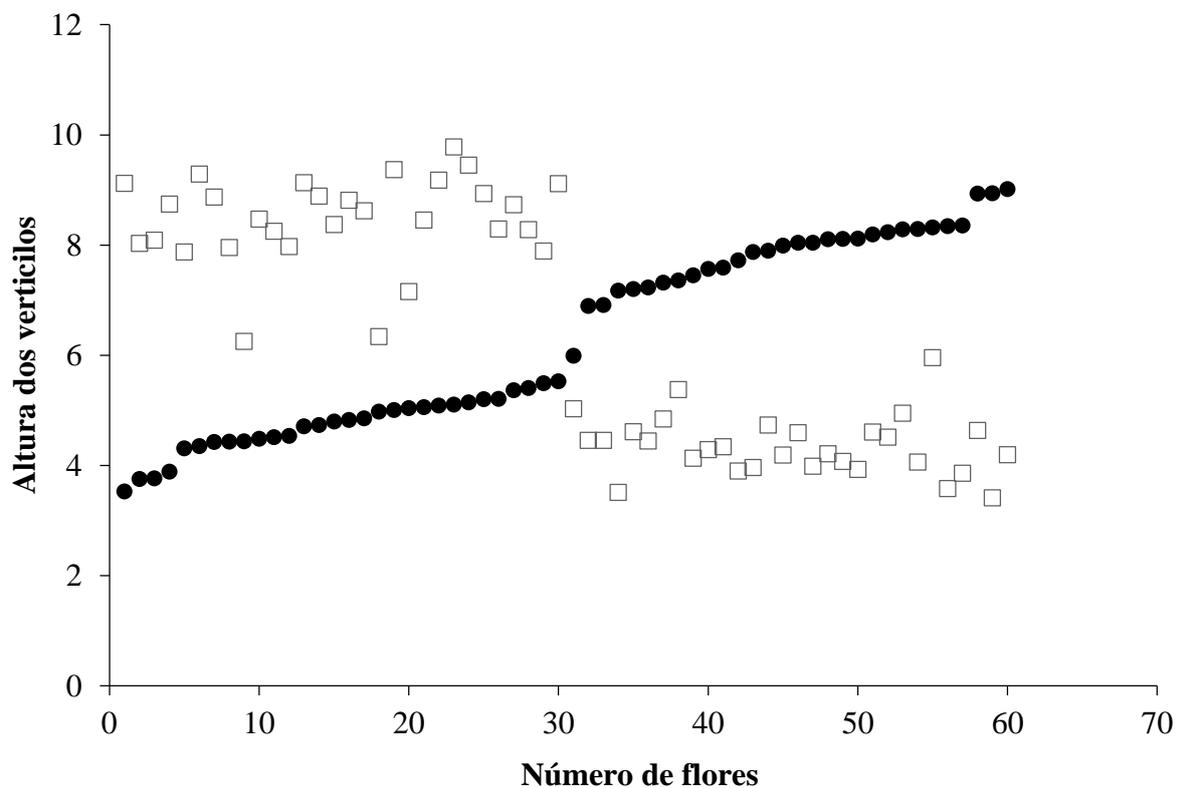


Figura 2. Variação em milímetros na altura dos pistilos (●) e dos estames (□) de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. As flores foram ordenadas de forma crescente pela altura dos pistilos (eixo x) para ilustrar a reciprocidade entre os verticilos reprodutivos em cada morfo. Pistilo longistilo ( $7,85 \pm 0,66$ ), e brevistilo ( $4,74 \pm 0,53$ ), estame longistilo ( $4,36 \pm 0,54$ ), e brevistilo ( $8,46 \pm 0,82$ ). Valores: Média  $\pm$  Desvio padrão.

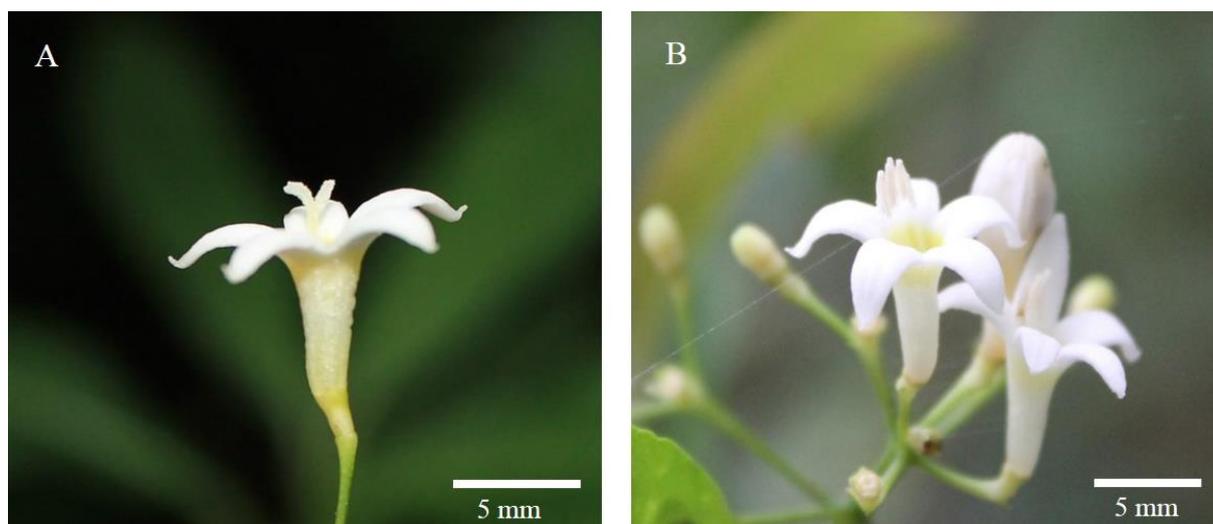


Figura 3. Flores de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. A. Flor longistila, B. Flor brevistila.

*Sistema de incompatibilidade e produção de néctar* - A população de *P. nitidula* apresentou formação de frutos apenas nas polinizações cruzadas intermorfo (legítimas), longistilo (40 flores, 33 frutos) e brevistilo (39 flores, 30 frutos). O Índice de Autoincompatibilidade foi igual à zero para ambos os morfos (valor < que 0,25 está nos limites da autoincompatibilidade), demonstrando um forte sistema de autoincompatibilidade.

As medidas tomadas de néctar não se diferenciaram, significativamente, entre os morfos. Volume: longistilo ( $2,09 \pm 0,52$ ), brevistilo ( $2,63 \pm 1,26$ ) ( $p > 0,05$ ,  $U = 168$ ), quantidade de açúcar: longistilo ( $0,70 \pm 0,23$ ), brevistilo ( $0,91 \pm 0,39$ ) ( $p > 0,05$ ,  $U = 132,5$ ); concentração (%): longistilo ( $29,30 \pm 4,03$ ) e brevistilo ( $31,80 \pm 5,14$ ) ( $p > 0,05$ ,  $U = 135,8$ ).

*Dimorfismo polínico* - O morfo longistilo apresentou grãos de pólen, significativamente, menores ( $14,69 \pm 0,06 \mu\text{m}$ ) do que os do morfo brevistilo ( $18,76 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ) ( $t = 44,68$ ;  $p < 0,0001$ ) (Fig. 4). A análise de distribuição de frequência dos grãos de pólen sugeriu 11 classes de tamanho (Fig. 5). Destas classes, apenas uma apresentou sobreposição acima de 20%, não sendo possível atribuir os grãos a nenhum dos morfos (74% de sobreposição com grãos entre 16 e 16,99  $\mu\text{m}$ ). As outras classes apresentaram sobreposição de 6% (15-15,99  $\mu\text{m}$ ) e 15% (17-17,99  $\mu\text{m}$ ), sendo-as atribuídas ao morfos longistilo e brevistilo, respectivamente. Dessa forma, para as análises de fluxo de pólen intermorfo, foram consideradas apenas três classes: grãos de pólen com diâmetro inferior a 16  $\mu\text{m}$  para longistilo, superior a 17  $\mu\text{m}$  para brevistilo e indeterminado entre 16-16,99  $\mu\text{m}$ .

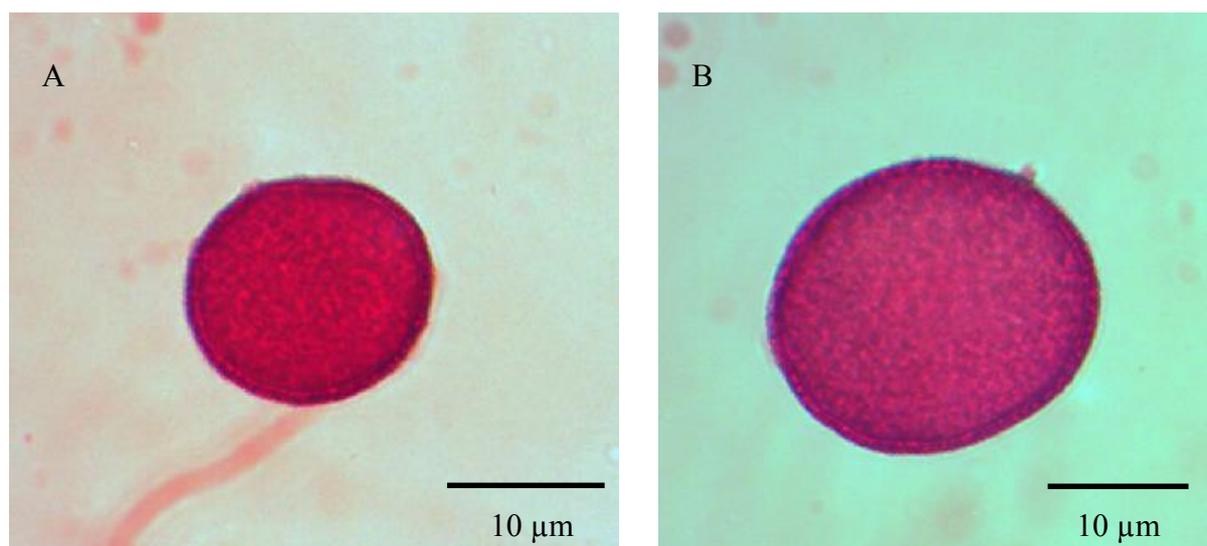


Figura 4. Grãos de pólen de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. A. Grão de pólen do morfo longistilo ( $14,69 \pm 0,06 \mu\text{m}$ ), B. Grão de pólen do morfo brevistilo ( $18,76 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ) Valores: Média  $\pm$  Desvio padrão.

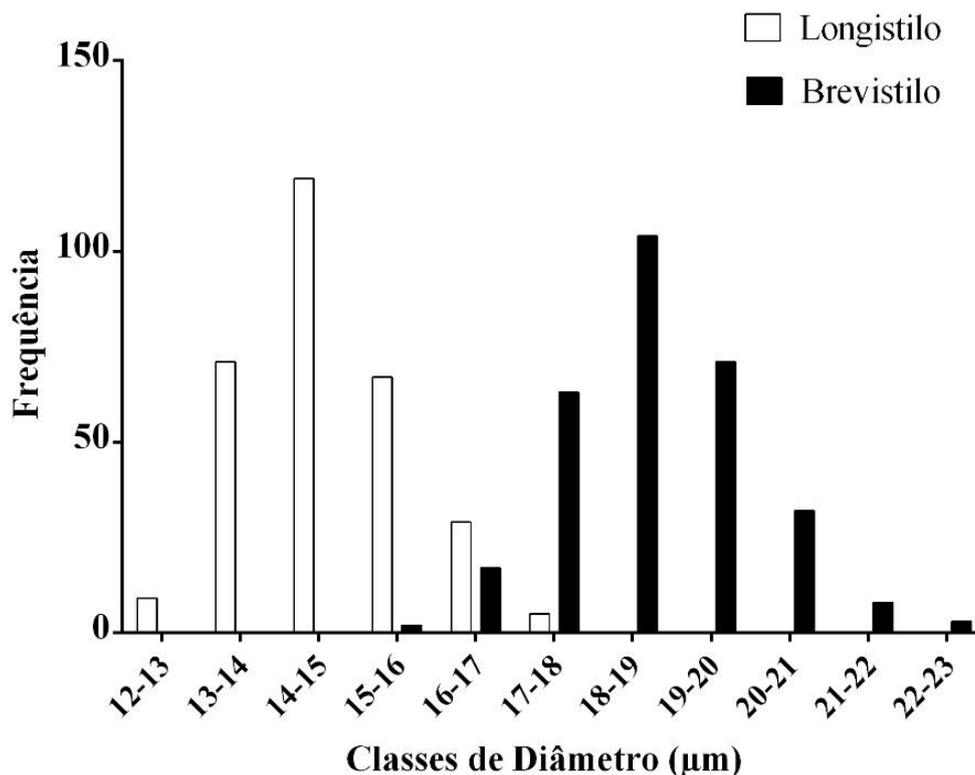


Figura 5. Distribuição da frequência do tamanho dos grãos de pólen dos morfos florais de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO.

*Produção e transferência de pólen* – O número médio de grãos de pólen produzidos por antera não diferiu entre os morfos, sendo que no brevistilo foi encontrado em média  $425,8 \pm 43,08$  grãos e no longistilo foi encontrado  $450,6 \pm 58,23$  ( $t=1,5312$ ;  $p= 0,134$ ). A produção média de pólen por flor seguiu a mesma igualdade, com o brevistilo produzindo  $1703,2 \pm 172,3$  e o longistilo  $1802,4 \pm 232,93$  grãos de pólen ( $t=1,5312$ ;  $p= 0,134$ ).

A quantidade de grãos de pólen presentes nos estigmas de *P. nitidula* variou tanto entre morfos quanto entre os tratamentos (Fig. 6). No que diz respeito à quantidade total de grãos, o morfo longistilo recebeu mais grãos de pólen do que o morfo brevistilo em todos os tratamentos (Fig. 6A). Quando comparado os tratamentos dentro de cada morfo, o controle (C) sempre apresentou mais grãos de pólen do que os outros dois tipos de tratamentos (ECF e EPV) (Fig. 6A). A quantidade de grãos nos estigmas das flores emasculadas e coletadas no final do dia (ECF) foi superior ao das flores emasculadas e coletadas após a primeira visita (EPV).

O número de grãos de pólen legítimos foi diferente entre os morfos e entre os tratamentos, com o brevistilo apresentando, significativamente, mais grãos legítimos do que o morfo oposto (Fig. 6B). A quantidade de pólen ilegítimo também foi diferente entre os morfos

e entre os tratamentos, porém ele foi maior no morfo longistilo com os estigmas do C apresentando mais grãos de pólen do que os demais (Fig. 6C). Quando analisado os valores de pólen ilegítimo do C e ECF para ambos os morfos, observa-se que o C apresenta, significativamente, maior carga polínica.

A probabilidade de cada morfo ter um fluxo de pólen legítimo também foi maior no morfo brevistilo (Fig. 7A). Entre os tratamentos do morfo brevistilo, as flores do EPV apresentaram maior probabilidade de receber pólen legítimo do que as flores do C e ECF (Fig. 7A). Para o longistilo, as flores ECF foram as que apresentaram maior probabilidade de receber pólen legítimo. Porém, essa probabilidade foi inferior ao valor de ECF do morfo brevistilo. Quando comparado as flores do EPV entre os morfos, nota-se que após a primeira visita o morfo brevistilo possui maior chance de fluxo de pólen legítimo do que o longistilo. O morfo longistilo apresentou maior probabilidade de fluxo de pólen ilegítimo do que o morfo brevistilo para todos os tratamentos (Fig. 7B). Para o longistilo, os tratamentos ECF e o EPV não apresentaram diferença, porém a probabilidade de fluxo ilegítimo foi maior do que o grupo C (Fig. 7B).

A capacidade de cada morfo doar e receber grãos de pólen dentro dos tratamentos foi assimétrica (Tab. 2). Em todos os tratamentos para os dois morfos, a capacidade de doar pólen ilegítimo foi maior do que doar legítimo. O morfo longistilo apresentou uma maior função masculina do que o brevistilo, tanto para pólen legítimo quanto para ilegítimo. Quando a comparação foi realizada na capacidade de receber pólen, o morfo longistilo apresentou maior capacidade de receber pólen ilegítimo do que legítimo, enquanto o morfo brevistilo apresentou maior capacidade de receber pólen legítimo (de duas a três vezes maiores) em todos os tratamentos (Tab. 2).

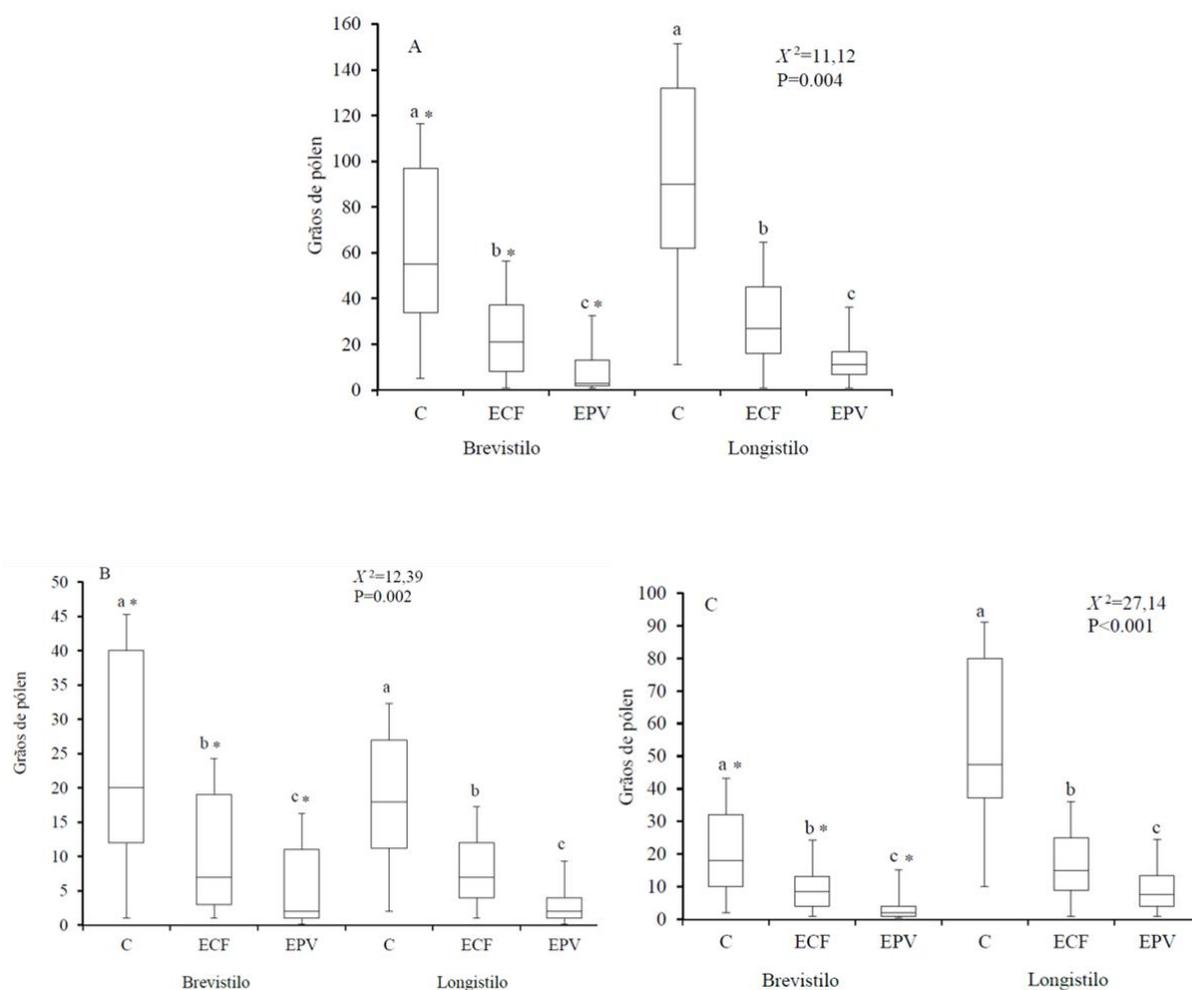


Figura 6. Número de grãos de pólen por estigma em *Psychotria nitidula* Cham. & Schldl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. (A) Quantidade total, (B) quantidade de pólen legítimo e (C) quantidade de pólen ilegítimo. Tratamento: (C) controle, (E.C.F) emasculado e coletado no final do dia e (E.P.V) emasculado e coletado após primeira visita. Valores: Mediana  $\pm$  IC. No centro do gráfico estão os resultados do Wald  $\chi^2$  para as comparações entre os morfos e entre os tratamentos. As letras minúsculas representam comparações entre os tratamentos dentro de cada morfo (Letras diferentes representam diferenças significativas;  $p<0,05$ ), os asteriscos representam comparações entre os morfos para tratamentos iguais (\*  $p<0,05$ ).

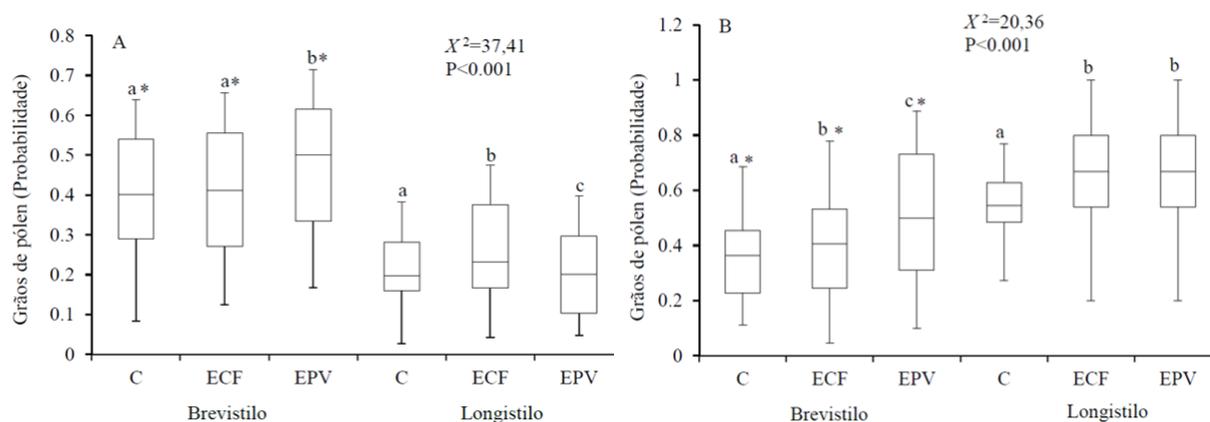


Figura 7. Probabilidade de cada morfo receber grãos de pólen legítimos e ilegítimos para cada morfo e tratamento em *Psychotria nitidula* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. (A) Probabilidade de receber pólen legítimo, (B) Probabilidade de receber pólen ilegítimo Tratamento: (C) Controle, (E.C.F) emasculado e coletado no final do dia, (E.P.V) emasculado e coletado após primeira visita. Valores: Mediana  $\pm$  IC. No centro do gráfico estão os resultados do Wald  $\chi^2$  para as comparações entre os morfos e entre os tratamentos. As letras minúsculas representam comparações entre os tratamentos dentro de cada morfo (Letras diferentes representam diferenças significativas  $p < 0,05$ ), os asteriscos representam comparações entre os morfos para tratamentos iguais (\*  $p < 0,05$ ).

Tabela 2. Proficiências da função masculina (doador) e feminina (receptor) ( $T_{ij}$ ) de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. Protocolo elaborado por Lloyd & Webb (1992). 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 e (E.P.V) emasculado e coletado após primeira visita.

Tratamentos	Doador	Receptor ( $T_{ij}$ )	
		Brevistilo	Longistilo
Controle	Brevistilo	$1,34 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-2}$
	Longistilo	$3,2 \times 10^{-2}$	$5,2 \times 10^{-2}$
ECF	Brevistilo	$0,61 \times 10^{-2}$	$0,55 \times 10^{-2}$
	Longistilo	$1,2 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-2}$
EPV	Brevistilo	$0,20 \times 10^{-2}$	$0,14 \times 10^{-2}$
	Longistilo	$0,40 \times 10^{-2}$	$0,90 \times 10^{-2}$

*Produção de inflorescências, flores, frutos e sementes* - Não foi encontrada diferença significativa entre morfos em nenhum dos parâmetros analisados, como o número de inflorescências, flores por inflorescência, frutos por inflorescência e total de flores e frutos por indivíduo (Tab. 3). Os valores de investimento reprodutivo mostraram que o morfo longistilo obteve um sucesso reprodutivo de 56,14% e o morfo brevistilo de 49,80%.

Tabela 3. Comparações entre a produção de inflorescências, flores e frutos entre os morfos de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. Valores: Média  $\pm$  Desvio padrão (nível de significância  $p < 0,05$ ).

Produção	Morfo		<i>t</i>	<i>p</i>
	Brevistilo	Longistilo		
N° de inflorescências por indivíduo	66,50 $\pm$ 5,11 (20)	71,60 $\pm$ 6,38 (20)	0,624	0,536
N° de flores por inflorescência	15,14 $\pm$ 0,47 (100)	15,02 $\pm$ 0,44 (100)	0,147	0,883
N° total de flores por indivíduo	1033 $\pm$ 79,44 (20)	1075 $\pm$ 95,80 (20)	0,338	0,737
N° de frutos por inflorescência	7,4 $\pm$ 0,41 (100)	8,5 $\pm$ 0,40 (100)	1,818	0,071
N° total de frutos por indivíduo	528,41 $\pm$ 47,07 (20)	565,25 $\pm$ 43,45 (20)	0,575	0,569

As flores de *P. nitidula* produziram de um a dois óvulos por flor, independente do morfo (20 flores brevistilas totalizando 36 óvulos e 20 longistilas com 37 óvulos;  $p = 0,9073$ ,  $Z = 0,1164$ ). O número de sementes viáveis formadas por morfo também não foi diferente estatisticamente (20 frutos brevistilos com 30 sementes e 20 longistilos com 27 sementes;  $p = 0,6929$ ,  $Z = 0,3949$ ). Quando se analisa a porcentagem das sementes formadas em relação ao número de óvulos produzidos, o morfo longistilo obteve um sucesso 83,33% na formação de sementes e o morfo brevistilo 72,97%.

*Visitantes florais e carga polínica* - Os visitantes de *P. nitidula* foram, exclusivamente, insetos pertencentes às ordens Himenoptera, Lepidoptera e Diptera. Do total de 1951 visitas observadas, 92,67% foram feitas por insetos da ordem Himenoptera, sobretudo da abelha *Apis mellifera* (83,34%), sendo considerada o polinizador principal desta população (Tab. 4). Durante as visitas, foi observado, nitidamente, que *A. mellifera* tocava os verticilos reprodutivos altos de ambos os morfos e, possivelmente, os verticilos baixos (Fig. 8A). O principal recurso buscado pelos Himenoptera foi o néctar, porém a abelha *Partamona rustica*

e *A. mellifera* também coletavam, esporadicamente, pólen (Fig. 8B). Os insetos da ordem Lepidoptera e Diptera foram considerados visitantes ocasionais devido sua baixa frequência (Tab. 4). Durante as observações foi notado que alguns polinizadores pertencentes à primeira ordem coletam néctar e tocavam os verticilos reprodutivos com a cabeça e a probóscide (Fig. 8C). Não foi registrada a presença de pilhadores.

O número de visitas entre os morfos foi, significativamente, diferente, sendo o longistilo (1092) visitado com maior frequência do que o brevistilo (859) ( $p < 0.001$ ;  $Z = 5,2835$ ). Foi encontrado que apenas quatro espécies não visitaram com maior frequência um dos morfos florais, sendo eles *Eulaema nigrata*, *Partamona rustica*, *Aellopos titan* e Lepidoptero sp. (Tab. 4). A abelha *Epicharis flava* visitou, apenas flores do morfo longistilo, enquanto *Augochloropsis* sp. 2 visitou apenas o morfo brevistilo (Tab. 4).

As abelhas que foram coletadas para estimar a carga polínica foram *A. mellifera* (dois indivíduos), *Epicharis flava* (quatro), *Eulaema nigrata* (um), *Paratetrapedia flaveola* (um), *Partamona rustica* (um) e *Augochloropsis* sp.1 (um). As de probóscide longa foram *Epicharis flava* e *Eulaema nigrata* e as curtas foram todas as outras. A carga polínica no corpo dos polinizadores demonstrou que não há deposição de pólen de cada morfo em partes específicas do corpo (Tab. 5), porém a deposição localizada foi observada quando as abelhas foram analisadas por classes de tamanho de probóscide. As abelhas de língua curta tiveram uma maior deposição de pólen brevistilo no tórax, por exemplo em *A. mellifera*, ao passo que o pólen longistilo se encontrou distribuído em quantidades semelhantes em todas as partes do corpo (Tab. 6). As abelhas de língua longa não apresentaram transporte de pólen de cada morfo em regiões específicos do corpo (Tab. 6). A carga polínica total dos morfos entre as abelhas de probóscide longa e curta não foi diferente, independentemente da parte do corpo. Abelhas de língua longa carregavam  $68 \pm 51,10$  grãos de pólen longistilo e  $58 \pm 78,33$  brevistilo e abelhas de língua curta  $8 \pm 2,56$  longistilo e  $43,5 \pm 47,20$  brevistilo (mediana,  $p = 0,095$ ,  $df = 3$ ,  $H = 6,369$ ).



Figura 8. Visitantes florais de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. A: *Apis mellifera* (Himenoptera), B: *Partamona rustica* (Himenoptera), C: Lepidoptera.

Tabela 4. Número total de visitas e frequência dos visitantes florais de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltldl. (Rubiaceae) no Parque Natural Municipal do Setor 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/Espécie	Nº total de visitas	Frequência relativa (%)	Morfortipo floral		Z	p
			Brevistilo	Longistilo		
<b>HYMENOPTERA</b>						
Apidaeae						
<i>Apis mellifera</i>	1.626	83,34	703	923	5,467	<0,0001
<i>Epicharis rustica flava</i>	66	3,38	0	66	10,656	<0,0001
<i>Eulaema nigrita</i>	29	1,49	15	14	0,183	0,8545
<i>Paratetrapedia flaveola</i>	10	0,51	1	9	2,672	0,0075
<i>Partamona rustica</i>	7	0,36	5	2	1,099	0,2717
<i>Augochloropsis</i> sp.1	9	0,46	0	9	3,464	0,0005
<i>Augochloropsis</i> sp.2	61	3,13	61	0	10,213	<0,0001
<b>LEPIDOPTERA</b>						
Sphingidaeae						
<i>Aellopos titan</i>	63	3,23	37	26	1,383	0,1667
Lepidoptera sp.	75	3,84	32	43	1,267	0,2051
<b>DIPTERA</b>						
Diptero sp.	5	0,26	5	0	2,413	0,0158

Tabela 5. Número de grãos de pólen de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltld. (Rubiaceae) presente nas diferentes partes do corpo dos polinizadores no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. *H*= valor do teste de Kruskal-Wallis. Valores: Mediana ± IC.

Partes do corpo	MORFO		Teste Kruskal-Wallis		
	Brevistilo	Longistilo	<i>df</i>	<i>H</i>	<i>p</i>
Probóscide	21,7±26,9	6,7±6,0	7	7,5378	0,371
Cabeça	28±48	11,4±11,6			
Tórax	30,6±37,9	13,8±16,9			
Abdômen	25,0±46,6	22,4±25,5			

Tabela 6. Grãos de pólen de *Psychotria nitidula* Cham. & Schltld. (Rubiaceae) presente nas diferentes partes do corpo dos polinizadores com distintos tamanhos de probóscide no Parque Natural Municipal do Setor Santa Cruz, Catalão, GO. Letras minúsculas representam comparações entre a quantidade de grãos de pólen de cada morfo em cada parte específica do corpo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). \* Representa comparações entre a quantidade de grãos de pólen de apenas um morfo entre as diferentes partes ( $p < 0,05$ ). *H*= valor do teste de Kruskal-Wallis. B: Brevistilo, L: Longistilo. Valores: Mediana ± IC.

Probóscide	Parte do corpo	Morfo	N° de Pólen	N° total	Teste Kruskal-Wallis						
					<i>df</i>	<i>H</i>	<i>p</i>				
<b>LONGAS</b>	Abdômen	B	10,4±17,8	5	7	2,885	0,896				
		L	51,8±102	5							
	Cabeça	B	50,6±105,3	5							
		L	22,2±21,6	5							
	Proboscíde	B	45,8±51,7	5							
		L	13,6±9,3	5							
	Tórax	B	18,4±12,5	5							
		L	28±33,1	5							
	<b>CURTAS</b>	Abdômen	B	32,3±48,6a				6	7	14,17	0,048
			L	2,7±2,4a				6			
Cabeça		B	9,2±2,0a	6							
		L	2,3±3,4a	6							
Proboscíde		B	6,7±1,5a	6							
		L	4±2a	6							
Tórax		B	40,8±77,2a *	6							
		L	8,3±3,6b	6							

## 6. DISCUSSÃO

A população estudada de *P. nitidula* possui os morfos longistilo e brevistilo em isoplelia, o sistema de incompatibilidade segue o padrão hetermórfico descrito para a distilia e a produção de flores, frutos e sementes foi a mesma para ambos os morfos, porém a HR foi ausente nos verticilos altos (segundo a estatística), houve deposição de pólen apenas nos polinizadores de proboscídea curta e o fluxo de pólen intermediado pelos polinizadores foi parcialmente assimétrico. Darwin (1877) foi o primeiro pesquisador a propor um modelo evolutivo para a heterostilia, no qual diz que o polimorfismo é uma estratégia reprodutiva para potencializar a transferência de grãos de pólen intermorfo por meio da deposição de grãos de pólen em partes específicas do corpo dos polinizadores por meio da HR e prediz que a condição morfológica antecede o sistema de incompatibilidade. Demais estudiosos sugeriram ainda que a HR reduziria a interferência sexual e, conseqüentemente, evitaria o desperdício de pólen em autopolinização e cruzamentos intramorfos (Baker 1964, Webb & Lloyd 1986). Os resultados do presente trabalho contradiz o modelo proposto por Darwin (1877) e demonstram que desvios em caracteres tidos como cruciais para manutenção e funcionalidade da distilia nem sempre afetam o sucesso reprodutivo e o equilíbrio na razão dos morfos (isoplelia), sobretudo quando o sistema de incompatibilidade é atuante.

Alguns estudos que encontraram populações anisopléticas atribuem esta característica a perda do sistema de incompatibilidade e, supostamente, a um serviço de polinização ineficiente (Sobrevila *et al.* 1983, Sakai & Wright 2008, Consolaro *et al.* 2011, Zhou *et al.* 2012). Contudo, eles não sabem ao certo se os polinizadores, de fato, compartilham dessa responsabilidade, uma vez que os trabalhos não investigaram os mecanismos do fluxo de pólen. Casos extremos de anisoplelia em Rubiaceae, como o monomorfismo, estão majoritariamente acompanhados da autocompatibilidade, como visto em *Palicourea petiolaris* (Sobrevila *et al.* 1983), *Psychotria hoffmanneggiana*, *P. micriantha*, *P. tenuifolia* (Sakai & Wright 2008), *Psychotria carthagenensis* (Consolaro *et al.* 2011), *P. goyazensis* (Rodrigues & Consolaro 2013) e *P. prunifolia* (Sá 2013). Desequilíbrios na razão dos morfos foi associado a um sistema de incompatibilidade relaxado em *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae) (Brys *et al.* 2008a, b) e *Hedyotis salzmamii* (Rubiaceae) (Riveros *et al.* 1995). A anisoplelia parece não ser apenas uma condição numérica da população, mas sim uma mudança qualitativa de xenogamia para autogamia a partir do relaxamento do sistema de incompatibilidade (Sakai & Wright 2008). Trabalho com *Faramea cyanea* (Rubiaceae) (Maruyama *et al.* 2010) discute que a ausência de HR da população pode não ter interferido

no fluxo de pólen intermorfo, uma vez que ela é isoplética, contudo, como visto em *Psychotria nitidula*, a falta de reciprocidade pode sim contribuir para um fluxo de pólen assimétrico e, mesmo assim, a isopletia ser mantida pelos mecanismos de incompatibilidade. Em *Luculia pinceana* (Rubiaceae) (Zhou *et al.* 2015), foi encontrado que a autocompatibilidade não acarretou desvios na isopletia devido, justamente, a HR intermediar o fluxo de pólen intermorfo, porém os autores discutem que em muitas espécies heterostílicas o sistema de incompatibilidade é uma premissa para uma completa reprodução cruzada. O que parece ocorrer, na realidade, é que o sistema de incompatibilidade tem uma grande responsabilidade na manutenção da distilia, pois, frequentemente, as variações na manifestação dos morfos florais estão associadas a espécies ou populações em que o sistema de incompatibilidade parece não atuar de modo esperado (Sakai & Wright 2008).

A deposição de pólen parcial do morfo brevistilo no tórax dos polinizadores de língua curta pode explicar em partes a assimetria no fluxo de pólen intermorfo. O fato de o morfo brevistilo ter mais pólen legítimo e maior probabilidade de receber pólen longistilo, além de ter maior probabilidade de receber pólen compatível já na primeira visita, pode ser explicado pela reciprocidade entre os verticilos baixos. Lau & Bosque (2003) estudando o fluxo de pólen em *Palicourea fendleri* Standl. (Rubiaceae) também encontraram que a transferência de pólen legítima foi maior nos verticilos baixos e associam o ocorrido a maior reciprocidade dos referidos verticilos. O morfo longistilo de *P. nitidula* não apresentou HR com o seu doador, justificando o porquê dele ter apresentado mais pólen incompatível, maior probabilidade de receber pólen ilegítimo e maior probabilidade de receber pólen compatível em flores do final do dia em comparação a flores de primeira visita. Os estudos clássicos de heterostilia discutem que a função da HR é a de deposição de pólen legítimo em partes do corpo que são correspondentes a região de contato do estigma do morfo oposto (Ganders 1979, Charlesworth & Charlesworth 1979, Barrett 1992). Contudo, os resultados do presente estudo mostram que nem sempre isso ocorre e que a deposição de pólen ao longo do corpo do visitante pode ser tão eficiente quanto a sua deposição corporalmente específica.

Muitos trabalhos demonstram que a eficiência da transferência de pólen pode variar de acordo com as diferentes espécies e grupos de polinizadores (e.g., abelhas, borboletas, beija-flores) (Waser 1988, Fishbein & Venable 1996, Mayfield *et al.* 2001). No caso de *P. nitidula*, a assimetria no fluxo de pólen também pode estar associada a esse fator, sobretudo pelo polinizador mais frequente ter sido *Apis mellifera*, uma espécie exótica. De acordo com as observações, *Apis mellifera* inseria a cabeça dentro do tubo da corola em busca do recurso, sendo que, aparentemente, tocava os verticilos baixos e altos. Para *Kallstroemia grandiflora*

(Zygophyllaceae) (Osorio-Beristain *et al.* 1997) e *Gelsemium sempervirens* (Loganiaceae) (Adler & Irwin 2006) essa mesma espécie de abelha foi menos eficiente na transferência de pólen do que as abelhas nativas, enquanto em *Asclepias tuberosa*, *A. incarnata* (Apocynaceae) (Fishbein & Venable 1996, Ivey *et al.* 2003) e *Brassica napus* (Brassicaceae) (Cresswell *et al.* 1995) ela foi tão eficiente quanto as nativas. Polinizadores de língua grande, inclusive abelhas, têm sido considerados mais eficientes no fluxo de pólen em espécies distílicas do que polinizadores de língua curta, pois seriam mais capazes de atingir o estigma do morfo brevistilo e as anteras do morfo longistilo (Ferrero *et al.* 2011b, Keller *et al.* 2014). *Apis mellifera*, uma abelha de língua curta, parece se enquadrar nesse exemplo de ineficiência no fluxo de pólen legítimo e, talvez, com o polinizador natural sendo de língua longa, essa assimetria no fluxo de pólen em *P. nitidula* poderia ser menor ou inexistente. Contudo, a falha desse serviço de polinização na população estudada parece ser suprida pelo sistema de incompatibilidade, pois a produção de frutos por indivíduo e a viabilidade das sementes foram, relativamente, altas.

Não há, aparentemente, uma explicação plausível para entender o motivo de o morfo longistilo ter sido mais visitado do que o brevistilo, pois as flores dos dois morfos não apresentaram diferenças no tamanho da corola e a quantidade e qualidade do néctar produzido também não diferiu entre eles (Sá 2013). Além disso, ambos os morfos apresentaram o mesmo guia de néctar na entrada do tubo da corola. O fato do longistilo ser mais visitado pode justificar a maior carga polínica em seu estigma em comparação ao do brevistilo, contudo essa vantagem quantitativa não significou uma carga polínica qualitativa, pois foi o estigma do morfo brevistilo que apresentou mais pólen compatível. O que poderia explicar tal assimetria é o fato de alguns visitantes serem mais eficientes na deposição de pólen de um morfo do que na remoção e o contrário é verdadeiro (Wilson & Thomson 1991, Conner *et al.* 1995), sobretudo quando o visitante mais frequente é uma abelha exótica. Entretanto, apesar dessas diferenças entre morfos, a presente população não manifestou um desequilíbrio na aptidão reprodutiva entre os morfotipos. Apesar disso, vale ressaltar que esse tipo de conflito pode, oportunamente, desencadear o início de um processo de especialização de gênero em espécies distílicas, uma vez que um morfo poderá doar e receber esporos em quantidades distintas em comparação ao morfo oposto.

A probabilidade de cada morfo doar e receber pólen, teoricamente, tem que ser a mesma em ambos os morfos para não causar desvios reprodutivos em populações distílicas (Lloyd & Webb 1992), como visto em cinco das dez populações estudadas de *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) (Hernandez & Ornelas 2007). Porém, os resultados de *P. nitidula*

demonstraram que o morfo longistilo desempenhou uma maior função masculina e o brevistilo uma maior função feminina. Assimetrias no sentido contrário também já foram relatadas em outras espécies distílicas (Stone & Thomson 1994, Keller *et al.* 2014). O desvio no desempenho da função sexual em *P. nitidula* parece não ter contribuído para um desvio na aptidão reprodutiva de cada morfo, pois a proporção dos morfos, a taxa de frutificação, a produção de sementes e a sua viabilidade foram semelhantes entre morfos. González *et al.* (2005) analisando diferenças nas funções dos sexos entre morfos em *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) ao longo de cinco anos, encontrou que a função variou ao longo dos anos, mas a isopleitia foi mantida, demonstrando que a presença da isopleitia nem sempre evita desvios na funcionalidade sexual entre morfos e, conseqüentemente, não assegura uma transferência de pólen legítima equilibrada para os tipos florais. Os padrões de fluxo de pólen encontrados na natureza demonstra que a funcionalidade desse sistema pode variar entre plantas da mesma população, entre diferentes populações da mesma espécie e ao longo tempo, sendo a assembleia de polinizadores um dos grandes responsáveis (Hernandez & Ornelas 2007).

A maioria das plantas heterostílicas que apresentam corola tubular tem seus estames fixados no tubo da corola (epipétalos), tendo o tamanho da corola um papel fundamental na relação de reciprocidade entre os tipos florais, pois isso faz com que as anteras sejam colocadas, equivalentemente, na posição do estigma do morfo oposto (Ganders 1979, Hernández & Ornelas 2007). Essa relação não é rara em espécies distílicas da família Rubiaceae (Kálmán *et al.* 2007, Keller *et al.* 2012) e atua com maior intensidade na altura dos estames do morfo brevistilo (Nishihiro *et al.* 2000, Faivre & McDade 2001). O papel da corola ainda não é clara nos processos evolutivos e funcionais de plantas heterostílicas, contudo acredita-se que a reciprocidade entre a altura dos estigmas e estames de morfos sejam influenciadas por pressões seletivas opostas (Faivre & McDade 2001). Porém, pelas flores de *P. nitidula* não apresentarem diferença no tamanho da corola e a reciprocidade ter sido maior entre os verticilos baixos, acredita-se que as pressões sobre os verticilos possam agir de modo independente. Em *P. nitidula*, a porção desprendida do filete na corola do morfo brevistilo é maior do que o do longistilo, o que pode explicar a maior variação na altura dos estames desse morfo, afetando dessa forma a falta de reciprocidade entre os verticilos altos. Curiosamente, os estames brevistilos são, consideravelmente, exsertos e dispostos de forma agregada em um único lado na porção superior da corola com o pistilo do morfo oposto alcançando a sua equivalência ao longo da longevidade, enquanto que os estames do morfo longistilo são dispostos, circularmente, no interior da corola. A partir da arquitetura estaminal agregada, seria esperado que o fluxo de pólen do morfo brevistilo para o longistilo fosse mais eficiente,

devido a uma deposição de pólen mais específica no corpo dos polinizadores, contudo os dados não mostraram isso. Estudos evolutivo-funcionais necessitam ser desenvolvidos para saber a verdadeira contribuição da disposição agregada dos estames do morfo brevistilo, principalmente em populações que possuem os polinizadores naturais como intermediadores no fluxo de pólen.

A população estudada apresentou diferenças no diâmetro dos grãos de pólen entre os morfos, porém a produção de pólen foi igualitária. Estudos clássicos de distília acreditam que o dimorfismo polínico e a produção diferenciada de pólen entre morfos são atributos associadas à facilitação no crescimento do tubo polínico, juntamente a alocação de recurso na produção de grãos maiores (Ganders 1979, Barrett 1992). O morfo brevistilo produziria grãos maiores, pois eles requerem uma maior reserva energética para percorrerem um maior caminho ao longo do estilete das flores longistilas, em contrapartida sua produção de pólen por antera seria menor (o contrário é verdadeiro). Contudo, outros trabalhos encontraram que solos com baixo teor de nutrientes afetam, negativamente, esses dois caracteres polínicos (Wolff & Liede-Schumann 2007, Lau & Stephenson 1994), o que faz sentido quando as variações se repetem entre populações de uma mesma espécie (Pailler & Thomson 1997, Faivre & MacDade 2001, Brys *et al.* 2008a). O presente estudo não averiguou quais fatores, realmente, interferem na diferenciação da população, mas do ponto de vista da funcionalidade da distília, ele pode ser um dos fatores que interfere nas chances de doação e recepção de pólen, uma vez que cada tipo de polinizador apresenta um comportamento perante determinada espécie vegetal.

A separação estigma-antera (hercogamia) nas flores de *P. nitidula* foi encontrada nos dois morfos, porém quando os tratamentos são comparados dentro de cada morfo, o estigma do tratamento controle sempre apresentou mais grãos de pólen do que aqueles com flores emasculadas, sendo em sua maioria grãos ilegítimos, o que demonstra que a hercogamia não evita a chegada de auto e intrapólen no estigma. Variações na hercogamia entre morfos ocorrem em várias espécies distílicas, podendo ser maior no morfo brevistilo (e.g. espécies de *Psychotria*, Consolaro 2008, espécies de *Cordia*, Opler *et al.* 1975, *Guettarda scabra* Richards & Koptur 1993), longistilo (e.g. *Palicourea padifolia*, Ree 1997, *Lithrum salicaria*, Mal & Lovett-Doust 1997) ou não haver diferença (e.g. *Gaertnera vaginata*, Pailler & Thompson 1997). Como visto em *P. nitidula*, o grau de hercogamia pode influenciar, diretamente, no processo de polinização, pois quanto menor for à separação, maiores são as chances de autopolinização (Ganders 1975, Glover & Barrett 1986, Barrett & Shore 1987, Mal & Lovett-Doust 1997). Muitos estudos tentam explicar que a oscilação na hercogamia

ocorre em função do comprimento do tubo da corola, devido seus estames serem epipétalos (Ganders 1979, Nishihira *et al.* 2000, Faivre & McDade 2001, Hernández & Ornelas 2007, Kálmán *et al.* 2007, Keller *et al.* 2012), mas tal discussão não pode ser utilizada para a população estudada, pois a força que parece guiar a hercogamia nessa espécie é o comprimento do filete.

Os resultados do presente estudo foram contra ao modelo evolutivo proposto por Darwin (1877), pois mostraram que a deposição de pólen em partes específicas do corpo dos polinizadores nem sempre resulta em um eficiente fluxo de pólen intermorfo, pois o pólen brevistilo, no qual foi o único morfo a depositar o grão em partes específicas, não chegou ao estigma oposto. Enquanto que o longistilo, pólen depositado ao longo do corpo, chegou com maior frequência ao estigma brevistilo. Há três fatores básicos que podem explicar a assimetria no fluxo de pólen de *P. nitidula*: (1) a HR dos verticilos baixos realmente possibilitou uma maior eficácia no fluxo de pólen; (2) a atuação ineficiente de um polinizador exótico prejudicou o fluxo de pólen; (3) a interferência sexual dos verticilos reprodutivos proporcionou um desequilíbrio de função, o que pode facilitar uma futura especialização de gênero na população (García-Robledo 2008). Os resultados do presente estudo não permitem entender o real estado evolutivo de *P. nitidula*, principalmente por se conhecer pouco a respeito do tema em Rubiaceae e por ele ter sido realizado apenas com uma população. Apesar disso, ainda é possível levantar alguns pontos que não podem ser ignorados: a condição de *P. nitidula* corrobora com o modelo evolutivo de Charlesworth & Charlesworth (1979), no qual prediz que o sistema de incompatibilidade antecede o estabelecimento da HR; a falta de reciprocidade pode ser um estágio subsequente ao estabelecimento do padrão distílico; a falta de reciprocidade não é uma condição evolutiva, mas sim um estado particular da população estudada. Estudos futuros com outras populações sobretudo com populações onde hajam polinizadores naturais, são necessários para ajudar a interpretar a funcionalidade da distília em *P. nitidula* e descobrir a força da interação planta-polinizador a partir da entrada de uma espécie exótica.

## 7. REFERÊNCIAS

- Adler, L.S. & Irwin, R.E. 2006. Comparison of pollen transfer dynamics by multiple floral visitors: experiments with pollen and fluorescent dye. *Annals of Botany* 97: 141-150.
- Bahadur, B. 1968. Pollen dimorphism in Three Heterostyled Rubiaceae 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. & Shore, B. 1987. Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* complex (Turneraceae). *Evolution* 41: 340-354.
- 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., Wilken, D.H. & Cole, W.W. 2000. Heterostyly in the Lamiaceae: the case of *Salvia brandegeei*. *Plant Systematics and Evolution* 223: 211- 219.
- Bawa, K.S. & Beach, J.H. 1983. Self-Incompatibility Systems in the Rubiaceae of a Tropical Lowland Wet Forest. *American journal of botany* 70: 1281–1288.
- Bremer, B. & Eriksson, T. 2009. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. *International Journal of Plant Sciences* 170: 766–793.
- Brys R., Jacquemyn H., Hermy M. & Beeckman T. 2008a. Pollen deposition rates and the functioning of distyly in the perennial *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *Plant Systematics and Evolution* 273: 1–12.
- Brys R., Jacquemyn H. & Beeckman T. 2008b. Morph-ratio variation, population size, and female reproductive success in distylous *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1281–1289.
- Bullock, S. H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest. *Biotropica*.
- 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.

- Castro, C.C. & Araújo, A.C. 2004. Distyly and sequential pollinators of *Psychotria nuda* (Rubiaceae) in the atlantic rain forest, Brazil. *Plant Systematic Evolution* 244: 131-139.
- Cesaro, A.C. & Thompson, J.D. 2004. Darwin. A.C. & Thompson, hypothesis and the evolution of stylar polymorphism. *Ecology Letters*, 7: 1209–1215.
- Charlesworth, D. & Charlesworth B. 1979. A model for the evolution of heterostyly. *American Naturalist* 114: 467–498.
- Chittka, L., Thomson, J.D. & Waser, N.M. 1999. Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *The Science of Nature* 86: 361-377.
- Coelho, P. & Barbosa, A.A.A. 2003. Reproductive biology of *Palicourea macrobotrys* Ruiz and Pavon (Rubiaceae): a possible case of homostyly in the genus *Palicourea* Aubl. *Brazilian Journal of Botany* 26: 403-413.
- Coelho, C.P. & Barbosa, A.A.A. 2004. Biologia reprodutiva de *Psychotria poeppigiana* Mull.Arg. (Rubiaceae) em Mata de Galeria. *Acta Botanica Brasilica* 18: 481-489.
- Coelho, C.P. 2013. Sistema reprodutivo, distilia e graus de reciprocidade em Rubiaceae arbustivas do Sub-Bosque de Formações Florestais do Cerrado. Tese de Doutorado. Universidade de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais, 175 p.
- Conner, J.K., Davis, R. & Rush, S. 1995. The effect of wild radish floral morphology on pollination efficiency by four taxa of pollinators. *Oecologia* 104: 234–245.
- Conner, J.K. & Rush, S. 1996. Effects of flower size and number on pollinator visitation to wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Oecologia* 105: 509–516
- 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., Toledo, R.D.P., Ferreguti, R.L., John, H. & Oliveira, P.E. 2009. Distilia e homostilia em espécies de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) do Cerrado do Brasil Central. *Revista Brasileira de Biociências* 32: 677-689.

- 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.
- Cresswell, J.E., Bassom, A.P., Bell, S.A., Collins, S.J. & Kelly, T.B. 1995. Predicted pollen dispersal by honey-bees and three species of bumble-bees foraging on oil-seed rape: a comparison of three models. *Functional Ecology* 9: 829–841.
- Darwin, C.R. 1877. The different forms of flowers on plants of the same species. John Murray, London.
- Davis, A.P., Bridson, D., Jarvis, C. & Govaerts, R. 2001. The typification and characterization of genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 135: 35-42.
- Delprete, P.G. 2004. Rubiaceae. In N. Smith, S.A., Mori, A., Henderson, D.W.M. & Heald, S.V. Flowering plants of the neotropics. Princeton and Oxford, New Jersey, *The New York Botanical Garden*. Princeton University Press. p. 328-333
- Faivre, A.E. & McDade, L.A. 2001. Population-level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of anthers and stigmas characterize heterostyly? *American Journal of Botany* 88: 841–853.
- Faria, R.R., Ferrero, V., Navarro, L. & Araujo, A.C. 2012. Flexible mating system in distylous populations of *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae) in Brazilian Cerrado. *Plant Systematics and Evolution* 298:619-627.
- Ferrero, V., Arroyo, J., Vargas, P., Thompson, J.D. & Navarro, L. 2009. Evolutionary transitions of style polymorphisms in *Lithodora* (Boraginaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 11:111–125.
- Ferrero, V.C.I., Arroyo, J., Vargas, P. & Navarro, L. 2011a. Reciprocal style polymorphisms are not easily categorised: the case of heterostyly in *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). *Plant Biology* 13: 7–18.
- Ferrero, V., Castro, S., Sánchez, J.M. & Navarro, L. 2011b. Stigma–anther reciprocity, pollinators, and pollen transfer efficiency in populations of heterostylous species of

- Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). *Plant Systematics and Evolution* 291:267–276.
- Ferrero, V., Arroyo, J., Castro, S. & Navarro, L. 2012. Unusual heterostyly: style dimorphism and self-incompatibility are not tightly associated in *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). *Annals of Botany* 109: 655–665.
- Fishbein, M., Venable, D.L. 1996. Diversity and temporal change in the effective pollinators of *Asclepias tuberosa*. *Ecology* 77: 1061–73.
- Fonseca, L.C.N., Almeida, E.M. & Alves, M.A.S. 2008. Fenologia, morfologia floral e visitantes de *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton (Rubiaceae) em uma área de Floresta Atlântica, Sudeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 22: 63-69.
- Galetto, L. & Bernardello, G. 2005. Rewards in flowers – Nectar. 261-313p. In: *Practical Pollination Biology*. Eds.: Dafni, A., Kevan, P. G.; Husband, B C. Enviroquest, Ltd. Cambridge, Ontario, Canada.
- Ganders, F.R. 1975. Mating patterns in self-compatible distylous populations of *Amsinckia* (Boraginaceae). *Canadian Journal of Botany* 53: 773–779.
- 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 lamarum* (Rubiaceae). *Evolutionary Ecology* 22:743–755.
- Glaetli, M. & Barrett, S.C.H. 2008. Pollinator responses to variation in floral display and flower size in dioecious *Sagittaria latifolia* (Alismataceae). *New Phytologist* 179: 1193-1201.
- Glover, D.E. & Barrett, S.C.H. 1986. Stigmatic pollen loads in populations of *Pontederia cordata*, from the southern US. *American Journal of Botany* 73: 1607-1612.
- 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.

- Grandisoli, E.A.C. 1997. Biologia reprodutiva e estrutura da população de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) em um fragmento de mata secundária em São Paulo (SP). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 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.
- Hernández, A. & Ornelas, J.F. 2007. Disassortative pollen transfer in distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a hummingbirds-pollinated shrub. *Écoscience* 14: 8-16.
- Hernández-Ramírez A.M. 2012. Distyly, Floral Visitors, and Fructification in 2 Natural Populations of *Psychotria nervosa* (Rubiaceae). *Ecoscience* 19:133-139.
- Hodgins, K.A. & Barrett, S.C.H. 2006. Female reproductive success and the evolution of mating-type frequencies in tristylous populations. *New Phytologist* 171: 569–580.
- Husband, B.C. & Barrett, S.C.H. 1992. Pollinator visitation in populations of tristylous *Eichhornia paniculata* in northeastern Brazil. *Oecologia* 89:365–371.
- Ivey, C.T., Martinez, P. & Wyatt, R. 2003. Variation in pollinator effectiveness in swamp milkweed, *Asclepias incarnata* (Apocynaceae). *American Journal of Botany* 90: 214–225.
- Kálmán, K., Medvegy, A., Penzes, Z. & Mihalik, E. 2007. Morph-specific variation of floral traits associated with reciprocal herkogamy in natural populations of *Primula vulgaris* and *Primula veris*. *Plant Systematics and Evolution* 268: 15–27.
- Kearns, C.A. & Inouye, D.W. 1993. *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, Nwot, Colorado. 583 p.
- Keller, B., De Vos, J. M. & Conti, E. 2012. Decrease of sexual organ reciprocity between heterostylous primrose species, with possible functional and evolutionary implications. *Annals of botany*, 110: 1233-1244.
- 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.

- Klein, D.E., Freitas, L. & Da Cunha, M. 2009. Self-incompatibility in a distylous species of Rubiaceae: is there a single incompatibility response of the morphs? *Sexual Plant Reproduction* 22:121-131.
- Koch, A.K., Silva, P.C. & Silva, C.A. 2010. Biologia Reprodutiva de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae), espécie distílica de fragmento floresta de mata ciliar, Centro Oeste do Brasil. *Rodriguésia* 61: 551-558.
- Kohn, J. & Barrett, S.C.H. 1992. Experimental Studies on the Functional Significance of Heterostyly. *Evolution* 46: 43. Ex
- Konh, J.R. & Barrett, S.C.H. 2012. Experimental Studies on the Funcional Significance of Heterostyly. *Evolution* 46: 43–55.
- Köppen, W. 1948. *Climatologia: Un estudo de lós climas de La Tierra*. México. Fondo de Cultura Económica.
- 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): an experimental test of the Disassortative Pollen Flow Hypothesis. *International Association for Ecology* 135:593–600.
- Lloyd, D.G. 1980 Sexual strategies in plants III. A quantitative method for describing the gender of plants. *New Zealand Journal of Botany* 18: 103–108.
- Lloyd, D.G. & Webb, C.J. 1992. The selection of heterostyly. *In*: S. C. H. Barrett (eds.) *Evolution and function of heterostyly*. Springer Verlag. New York. p. 179-207.
- Lopes, L.E. & Buzato, S. 2005. Biologia reprodutiva de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) e a abordagem de escalas ecológicas para a fenologia de floração e frutificação. *Revista Brasileira de Botânica* 28: 785-795.
- Machado, A.O., Silva, A.P., Consolaro, H., Barros, M.A.G. & Oliveira, P.E. 2010. Breeding biology and distyly in *Palicourea rigida* H. B. & K. (Rubiaceae) in the Cerrados of Central Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 24: 686-696.

- Mal, T.K. & Lovett-Doust, J. 1997. Morph frequencies and floral variation in a heterostylous colonizing weed, *Lythrum salicaria*. *Canadian Journal of Botany* 75: 1034-1045.
- Maruyama, P.K., Amorim, F.W. & Oliveira, P.E. 2010. Night and day service: Distyly 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* 95:389–99.
- Mayfield, M.M., Waser, N.M. & Price, M.V. 2001. Exploring the ‘most effective pollinator principle’ with complex flowers: bumblebees and *Ipomopsis aggregata*. *Annals of Botany* 88:591–96.
- Mendonça, L.B. & Anjos, L. 2006. Flower morphology, nectar features, and hummingbird visitation to *Palicourea crocea* (Rubiaceae) in the Upper Paraná River floodplain, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 78: 45-57.
- Mendonça, R.C., Feleili, 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.
- Mitchell, R.J. 1994. Effects of floral traits, pollinator visitation, and plant size on *Ipomopsis aggregata* fruit production. *American Naturalist* 143:870–889.
- Nishihiro, J, Washitani, I., Thomson, J.D. & Thomson, B.A. 2000. Patterns and consequences of stigma height variation in a natural population of a distylous plant, *Primula sieboldii*. *Functional Ecology* 14: 502–512.
- Oliveira, A.S. 2008. Biologia reprodutiva de *Psychotria* L. (Rubiaceae) em floresta estacional semidecidual no sudeste brasileiro. Dissertação de Mestrado. Unicamp.
- Opler, P.A., Baker, H.G. & Frankie, G.W. 1975. Reproductive biology of some Costa Rican *Cordia* species (Boraginaceae). *Biotropica* 7: 234-247

- Osorio-Beristain, M., Dominguez, C.A., Eguiarte, L.E. & Benrey, B. 1997. Pollination efficiency of native and invading Africanized bees in the tropical dry forest annual plant, *Kallstroemia grandiflora* Torrex Gray. *Apidologie* 28: 11–16.
- 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: 315-327.
- Passos, L. & Sazima, M. 1995. Reproductive biology of the distylous *Manettia luteo-rubra* (Rubiaceae). *Boc. Acta*. 108(4): 309-313.
- Pelissaro, T.M. 2012. Fenologia e biologia floral de três espécies simpátricas de *Psychotria* L. (Rubiaceae) em floresta estacional em Santa Maria, RS, Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade Federal De Santa Maria. Programa De Pós-Graduação Em Agrobiologia Fenologia 76 p.
- Pereira, Z.V., Vieira, M.F. & Carvalho-Okano, R.M. 2006. Fenologia da floração, morfologia floral e sistema de incompatibilidade em espécies distílicas de Rubiaceae em fragmento florestal do sudeste brasileiro. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 471-480.
- 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. 2008. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: S.M. Sano; S.P. Almeida & J.F. Ribeiro (eds.). *Cerrado: ecologia e flora*. Planaltina. Embrapa Cerrados. p. 151-212.
- Richards, J.H. & Koptur, S. 1993. Floral Variation and distyly in *Guettarda scraba* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 80: 31-40
- Riveros, G.M., Barría, O.R. & Humaña, A.M.P. 1995. Self- compatibility in distylous *Hedyotis salzmanii* (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 194: 1-8.
- Robbrechet, E. 1988. Tropical woody Rubiaceae. *Opera Botânica Bélgica*, Totnes.
- 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.

- Rossi, A.A.B., Oliveira, L.O. & Vieira, M.F. 2005. Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 28: 285-294.
- 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.
- 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: 12-134.
- Sampson, D. A. & Krebs, R. A. 2012. Quantitative evaluation of reciprocal herkogamy in the distylous species, *Hedyotis caerulea* (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 298: 1361–1370.
- Santos-Gally, R., Pérez-Barrales, R., Simón-Porcar, V. I. & Arroyo, J. 2013. The role of short-tongued insects in floral variation across the range of a style-dimorphic plant. *Annals of Botany* 111:317-28.
- Sánchez, J.M., Ferrero, V. & Navarro, L. 2013. Quantifying reciprocity in distylous and tristylous plant populations. *Plant Biology* 15:616–620.
- Sapir, Y. 2009. Effects of floral traits and plant genetic composition on pollinator behavior. *Arthropods Plants Interaction*. 3: 115-129.
- 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. 2005. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseada em APG II*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.

- Stanton, M.L. 1987. Reproductive biology of petal colour variants in wild populations of *Raphanus sativus*. Pollinator response to colour morphs. *American Journal of Botany* 74: 178–187.
- Stone, J.L. & Thomson, J.D. 1994. The evolution of distyly: pollen transfer in artificial flowers. *Evolution* 48: 1595–1606.
- Stone, J.L. 1995. Pollen Donation Patterns in a Tropical Distylous shrub *Psychotria suerrensis*; Rubiaceae. *American journal of botany* 82: 1390–1398.
- Santos, O.A., Webber, A.C. & Costa, F.R.C. 2008. Biologia reprodutiva de *Psychotria spectabilis* Steyrm. e *Palicourea* cf. *virens* (Poepp & Endl.) Standl. (Rubiaceae) em uma floresta tropical úmida na região de Manaus, AM, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 22: 275-285.
- Teixeira, L.A.G. & Machado, I. C. 2004a. *Sabicea cinerea* Aubl. (Rubiaceae): distilia e polinização em um fragmento de floresta Atlântica em Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira Botânica* 1: 193-204.
- Teixeira, L.A.G. & Machado, I. C. 2004b. Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 18: 853-862.
- Valois-Cuesta, H. 2008. Diestilia y ecología de la polinización de *Palicourea demissa* Standl. (Rubiaceae) en una Selva Nublada de los Andes venezolanos. Dissertação de mestrado. Universidad de Los Andes, Postgrado en Ecología Tropical 94 p.
- Vieira, D.L.M., Coutinho, A.G. & Da Rocha G.P.E. 2012. Resprouting Ability of Dry Forest Tree Species after Disturbance Does Not Relate to Propagation Possibility by Stem and Root Cuttings. *Restoration Ecology* 21: 305-311.
- Virillo, C.B., Ramos, F.N., Castro, C.C. & Semir, J. 2007. Floral biology and breeding system of *Psychotria tenuinervis* Muell. Arg. (Rubiaceae) in the Atlantic rain forest, SE Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 21: 879-884.
- Waser, N.M. 1988. Comparative pollen and dye transfer by pollinators of *Delphinium nelsonii*. *Functional Ecology*. 2: 41–48.

- 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.
- Wilson, P. & Thomson, J.D. 1991. Heterogeneity among floral visitors leads to discordance between removal and deposition of pollen. *Ecology* 72: 1503–1507.
- 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.
- Zhou, W., Barrett, S.C.H., Wang, H. & Li, D.Z. 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.Z. 2015. Reciprocal herkogamy promotes disassortative mating in a distylous species with intramorph compatibility. *New Phytologist* 206: 1503–1512.

## ANEXO I

**Trabalhos científicos sobre o sistema distílicos de diferentes espécies de Rubiaceae no Brasil. Populações foram consideradas distílicas típicas quando apresentaram duas ou mais características que caracterizam o polimorfismo.**

Família	Espécie	Manifestação da distília	Local de estudo	Referência
Rubiaceae	<i>Sabicea cinerea</i>	Atípica	Brasil	Teixeira & Machado (2004a)
Rubiaceae	<i>Declieuxia fruticosa</i>	Típica	Brasil	Não publicado
Rubiaceae	<i>Faramea cyanea</i>	Típica	Brasil	Maruyama <i>et al.</i> (2010), Consolaro (2008)
Rubiaceae	<i>Faramea occidentalis</i>	Atípica	Brasil	Não publicado
Rubiaceae	<i>Palicourea crocea</i>	Típica	Brasil	Mendonça & Anjos (2006)
Rubiaceae	<i>Palicourea croceoides</i>	Típica	Brasil	Não publicado
Rubiaceae	<i>Palicourea coriacea</i>	Típica	Brasil	Consolaro <i>et al.</i> (2009)
Rubiaceae	<i>Palicourea longepedunculata</i>	Típica	Brasil	Pereira <i>et al.</i> (2006)
Rubiaceae	<i>Palicourea macrobotrys</i>	Atípica	Brasil	Coelho & Barbosa (2003)
Rubiaceae	<i>Palicourea macrobotrys</i>	Atípica	Brasil	Consolaro <i>et al.</i> (2009)
Rubiaceae	<i>Palicourea marcgravii</i>	Típica	Brasil	Consolaro <i>et al.</i> (2009)
Rubiaceae	<i>Palicourea marcgravii</i>	Típica	Brasil	Pereira <i>et al.</i> (2006)
Rubiaceae	<i>Palicourea officinalis</i>	Típica	Brasil	Consolaro <i>et al.</i> (2009)
Rubiaceae	<i>Palicourea rigida</i>	Típica	Brasil	Machado <i>et al.</i> (2010)
Rubiaceae	<i>Palicourea rigida</i>	Típica	Brasil	Não publicado
Rubiaceae	<i>Palicourea cf. virens</i>	Atípica	Brasil	Santos <i>et al.</i> (2008)
Rubiaceae	<i>Psychotria barbiflora</i>	Atípica	Brasil	Teixeira & Machado (2004b)
Rubiaceae	<i>Psychotria birotula</i>	Típica	Brasil	Castro <i>et al.</i> (2004)
Rubiaceae	<i>Psychotria brachypoda</i>	Atípica	Brasil	Fonseca <i>et al.</i> (2008), Consolaro

				(2008)
Rubiaceae	<i>Psychotria capitata</i>	Típica	Brasil	Não publicado
Rubiaceae	<i>Psychotria capitata</i>	Típica	Brasil	Não publicado
Rubiaceae	<i>Psychotria capitata</i>	Típica	Brasil	Não publicado
Rubiaceae	<i>Psychotria carthagenensis</i>	Típica/Atípica	Brasil	Koch <i>et al.</i> (2010)
Rubiaceae	<i>Psychotria carthagenensis</i>	Típica	Brasil	Faria <i>et al.</i> (2012)
Rubiaceae	<i>Psychotria carthagenensis</i>	Atípica	Brasil	Consolaro <i>et al.</i> (2011)
Rubiaceae	<i>Psychotria carthagenensis</i>	Atípica	Brasil	Não publicado
Rubiaceae	<i>Psychotria colorata</i>	Típica	Brasil	Não publicado
Rubiaceae	<i>Psychotria conjugens</i>	Típica	Brasil	Pereira <i>et al.</i> (2006)
Rubiaceae	<i>Psychotria deflexa</i>	Típica	Brasil	Não publicado
Rubiaceae	<i>Psychotria goyazensis</i>	Atípica	Brasil	Rodrigues & Consolaro (2013)
Rubiaceae	<i>Psychotria gracilentia</i>	Atípica	Brasil	Não publicado
Rubiaceae	<i>Psychotria hastisepala</i>	Típica	Brasil	Pereira <i>et al.</i> (2006)
Rubiaceae	<i>Psychotria hoffmanneggiana</i>	Típica	Brasil	Não publicado,
Rubiaceae	<i>Psychotria hygrophiloides</i>	Atípica	Brasil	Pereira <i>et al.</i> (2006)
Rubiaceae	<i>Psychotria ipecacuanha</i>	Típica	Brasil	Rossi <i>et al.</i> (2005)
Rubiaceae	<i>Psychotria jasminoides</i>	Típica	Brasil	Castro <i>et al.</i> (2004)
Rubiaceae	<i>Psychotria leiocarpa</i>	Atípica	Brasil	Não publicado,
Rubiaceae	<i>Psychotria mapouridoides</i>	Típica	Brasil	Castro <i>et al.</i> (2004)
Rubiaceae	<i>Psychotria myriantha</i>	Atípica	Brasil	Pelissaro (2012)
Rubiaceae	<i>Psychotria nuda</i>	Típica	Brasil	Castro & Araújo (2004), Pereira <i>et al.</i> (2006)
Rubiaceae	<i>Psychotria nuda</i>	Típica	Brasil	Klein <i>et al.</i> (2009)
Rubiaceae	<i>Psychotria poeppigiana</i>	Típica	Brasil	Coelho & Barbosa (2004)
Rubiaceae	<i>Psychotria prunifolia</i>	Atípica	Brasil	Não publicado, Oliveira (2008)
Rubiaceae	<i>Psychotria pubigera</i>	Atípica	Brasil	Castro <i>et al.</i> (2004)
Rubiaceae	<i>Psychotria sessilis</i>	Típica	Brasil	Pereira <i>et al.</i> (2006)

Rubiaceae	<i>Psychotria suterella</i>	Atípica	Brasil	Grandisioli (1997)
Rubiaceae	<i>Psychotria suterella</i>	Típica	Brasil	Lopez & Buzato (2005)
Rubiaceae	<i>Psychotria tenuinervis</i>	Típica	Brasil	Virillo <i>et al.</i> (2007)
Rubiaceae	<i>Psychotria trichophoroides</i>	Típica	Brasil	Oliveira 2008
Rubiaceae	<i>Rudgea lanceolata</i>	Típica	Brasil	Pereira <i>et al.</i> (2006)
Rubiaceae	<i>Manettia luteo-rubra</i>	Típica	Brasil	Passos & Sazima 1995

---