



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE DUAS ESPÉCIES DE *Palicourea* (RUBIACEAE) EM
FLORESTA DE TERRA FIRME NA AMAZÔNIA CENTRAL**

DARIENE DE LIMA SANTOS

Manaus, Amazonas
Dezembro, 2016

DARIENE DE LIMA SANTOS

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE DUAS ESPÉCIES DE *Palicourea* (RUBIACEAE) EM
FLORESTA DE TERRA FIRME NA AMAZÔNIA CENTRAL**

ORIENTADOR: DR. ERICH FISCHER

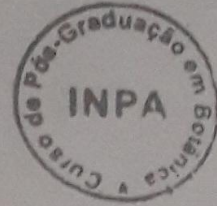
Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Botânica.

Manaus, Amazonas
Dezembro, 2016



DIVISÃO DOS
CURSOS DE
PÓS-GRADUAÇÃO

AULA DE QUALIFICAÇÃO



PARECER

Aluna: **Dariene de Lima Santos**
Curso: BOTÂNICA
Nível: Mestrado
Orientador: **Erich Fischer (INPA)**

Título:

"Biologia reprodutiva de duas espécies de Palicourea (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia Central"

BANCA JULGADORA

TITULARES:

MICHAEL JOHN GILBERT HOPKINS (INPA)
CRISTINA KRUG (EMBRAPA)
MARIO HENRIQUE TERRA ARAUJO (INPA)

SUPLENTE:

VALDELY FERREIRA KINUPP (IFAM)
ADRIAN PAUL ASHTON BARNETT (INPA)

EXAMINADORES	PARECER	ASSINATURA
MICHAEL JOHN GILBERT HOPKINS	(x) Aprovado () Reprovado	
CRISTINA KRUG	(x) Aprovado () Reprovado	
MARIO HENRIQUE TERRA ARAUJO	(x) Aprovado () Reprovado	
VALDELY FERREIRA KINUPP	() Aprovado () Reprovado	
ADRIAN PAUL ASHTON BARNETT	() Aprovado () Reprovado	

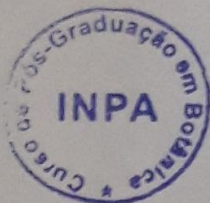
Manaus (AM), 06 de Março de 2015.

OBS: RECOMENDAMOS QUE A ALUNA TENHA ATENÇÃO AO NÚMERO DE
OBSERVAÇÕES A SEREM FEITAS PARA ESTA AULA (PÚBLICA) MAIS CONFIANTE.

Dr. Michael John Gilbert Hopkins
Coordenador do Programa de
Pós Graduação em Botânica
PO. 258/2014 - DUBO/INPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DO INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA
Av. André Araújo, 2936 – Bairro: Aleixo – Caixa Postal: 2223 – CEP: 69080-971- Manaus/AM.
Fone/Fax: (+55) 92 3643-3119

site: <http://pg.inpa.gov.br> e-mail: pgbotanica@inpa.gov.br



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO
DE MESTRADO DE DISCENTE DO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA DO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA
AMAZÔNIA

Aos vinte e nove dias do mês de junho de 2016 às 09:30h, no auditório da Biblioteca do INPA Campus I, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Dr. Rogério Gribel Soares Neto, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Dra. Cristiane Krug, da EMBRAPA e Dr. Antonio Carlos Webber da Universidade federal do Amazonas - UFAM tendo como suplentes: Dr. Adrian Paul Ashton Barnett, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA e Dr. Michael Hopkins do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA sob a presidência do primeiro titular, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, intitulada: "Biologia reprodutiva de duas espécies de *Palicourea* Aubl. (*Rubiaceae*) em floresta de terra firme na Amazônia Central", da discente: **Dariene de Lima Santos**, sob orientação: Orientador: Dr. Erich Fischer (INPA). Após a exposição, dentro do tempo regulamentar, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final:

EXAMINADORES

PARECER

ASSINATURA

ROGÉRIO GRIBEL SOARES NETO
CRISTIANE KRUG
ANTONIO CARLOS WEBBER
ADRIANO PAUL A. BARNETT
MICHAEL JOHN GILBERT HOPKINS

APROVADO () REPROVADO
 APROVADO () REPROVADO
 APROVADO () REPROVADO
() APROVADO () REPROVADO
() APROVADO () REPROVADO

R. G. Soares Neto
Cristiane Krug
Antonio C. Webber

Manaus (AM), 29 de junho de 2016.

OBS: A BANCA SUGERE QUE AS CORREÇÕES PROPOSTAS SEJAM INCORPORADAS NA VERSÃO FINAL DO TRABALHO

Nada mais havendo, foi lavrado a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Michael John Gilbert Hopkins
Dr. Michael John Gilbert Hopkins
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Botânica
PO. 258/2014 - DCB/INPA

- S237 Santos, Dariene de Lima
Biologia reprodutiva de duas espécies de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia / Dariene de Lima Santos. --- Manaus: [s.n.], 2016.
58 f.: il.
- Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2016.
Orientadora: Erich Fischer
Área de concentração: Botânica
1. *Palicourea corymbifera*. 2. Nectários pericárpicos. 3. Formigas.
I. Título.

CDD 583.52

Sinopse:

O presente trabalho apresenta a biologia reprodutiva de *Palicourea corymbifera* e *P. nitidella* (Rubiaceae) na Amazônia, abrangendo aspectos relacionados à fenologia reprodutiva, biologia floral, sistema reprodutivo e visitantes florais, além de um estudo para avaliar o papel dos visitantes florais e da presença de formigas sobre a polinização e a produção de frutos dessas duas espécies de plantas.

Palavras – chave: *Palicourea corymbifera*, nectários pericárpicos, formigas.

Aos meus pais dedico.

Agradecimentos

A Deus o rei dos reis e senhor dos senhores, pela vida, pelas oportunidades, pela força diante das dificuldades e por todas as vitórias;

Ao meu pai Eugênio e a minha mãe Lolita, pelo amor, carinho e dedicação;

Ao meu querido amado Eberton Sales que tem me acompanhado em tantas etapas, dando sempre sua maravilhosa contribuição;

Ao meu orientador Erich Fischer, por toda sua dedicação e paciência, embora distante sempre se fez presente;

Ao Dr. Jorge Souza, que gentilmente identificou as formigas. Sempre muito prestativo;

Ao Dr. Márcio Oliveira pela identificação das abelhas, ao Dr. Mário Cohn-Haft pela identificação dos beija-flores e a Msc. Kelve Franklimara pela identificação das borboletas;

Aos meus queridos amigos da segurança da Reserva Ducke: Adailson Andrade, Francivaldo Oliveira e Rosinaldo Ferreira pelo valoroso esforço e apoio disponibilizado durante todo o período de execução deste trabalho. Sem vocês tudo seria mais difícil;

Ao meu querido amigo José Edmilson da Costa pelo carinho, e pelo auxílio voluntário na busca incansável por minhas plantas;

A minhas amigas que voluntariamente me ajudaram nas observações de campo: Marcilia Freitas, Aline Assam e Raquel Souza;

A Lucélia Santos por sua amizade e pelos bons momentos de entretenimento que passamos juntas;

A todos os professores do curso, pela orientação, apoio, incentivo e conhecimentos compartilhados;

Ao Dr. Michael Hopkins, coordenador do curso de Botânica, pela prestatividade em diversos momentos;

A Neide e Léia, secretárias do curso de Botânica/INPA, pelo auxílio e atenção durante todo o curso;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela oportunidade e pelo apoio durante a realização do curso de mestrado em Botânica;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo;

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

As plantas são parte da diversidade e fonte de energia para vários organismos que podem atuar positiva ou negativamente sobre o sucesso reprodutivo delas. Durante a reprodução, muitas plantas interagem com vetores de pólen e outros herbívoros, influenciando o resultado da polinização e a formação de frutos e sementes. Os objetivos deste trabalho são descrever a biologia reprodutiva de *Palicourea corymbifera* e *P. nitidella* (Rubiaceae) em sub-bosque da floresta Amazônica, e avaliar o papel que os visitantes florais e a presença de formigas exercem sobre a polinização e a produção de frutos dessas duas espécies de planta. O estudo foi realizado na reserva florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, entre novembro de 2014 e janeiro de 2016. *Palicourea corymbifera* iniciou a floração em junho e apresentou pico em setembro quando os primeiros indivíduos iniciaram frutificação, ao passo que *P. nitidella* floresceu a partir de setembro e frutificou a partir de novembro. As populações de ambas as espécies apresentaram distília, contudo, *P. nitidella* apresentou dois morfos semi-homostílicos adicionais, nomeados aqui “variante brevistilo” (VB) e “variante longistilo” (VL). *Palicourea corymbifera* e *P. nitidella* apresentaram autoincompatibilidade, embora os morfos variantes tenham formado 1 a 2% de frutos por geitonogamia. Os morfos VB e VL apresentaram relação peculiar de incompatibilidade entre eles e os demais morfos, uma vez que VL foi compatível com pólen dos morfos brevistilo e VB, mas incompatível com pólen dos morfos (VL) e longistilo. As flores das duas espécies são crepusculares diurnas, tubulares e inodoras; a concentração de açúcares no néctar variou de 17 e 26%. Beija-flores, abelhas e borboletas visitaram flores de *P. corymbifera* e *P. nitidella*. Baseado no comportamento de visitas e no contato com anteras e estigmas, os beija-flores foram os principais polinizadores e algumas espécies de abelhas foram ladrões de néctar ou pólen. Treze e dez espécies de formigas patrulharam e visitaram nectários pericárpicos nas inflorescências de *P. corymbifera* e *P. nitidella*, respectivamente. Por meio de experimentos com controle da presença/ausência de formigas, a formação de frutos apresentou mais sucesso em inflorescências com formigas presentes que naquelas com formigas ausentes. Entretanto, a composição de espécies visitantes e o total de visitas por flor não apresentaram diferença significativa entre inflorescências com formigas presentes ou ausentes. Por outro lado, a composição de espécies visitantes diferiu entre *P. corymbifera* e *P. nitidella* apesar dessas plantas compartilharem várias espécies visitantes. Além disso, o número de visitas de abelhas e borboletas por flor foi maior nas inflorescências de *P. nitidella* do que nas de *P. corymbifera*, mas o número de visitas de beija-flores por flor não diferiu entre elas. Em geral, a presença de formigas não apresenta efeitos perceptíveis sobre as espécies visitantes de *Palicourea* ou sobre suas frequências de visitas, portanto o aumento da formação de frutos na presença de formigas parece ser relacionado com a proteção conferida por elas contra outros herbívoros. A grande frequência de abelhas, que são menos eficientes para polinizações legítimas em espécies distílicas, poderiam explicar a ocorrência de morfos semi-homostílicos em *P. nitidella*, visto que a eficiência no fluxo de pólen intermorfo pelas abelhas pode ser reduzido, levando conseqüentemente a quebra da distília.

Abstract

The plants are part of biodiversity and source of energy for several organisms that may act positively or negatively on their reproductive success. During the reproduction, most plants interact with pollen vectors and other herbivores, affecting the pollination output and fruit and seed set. The objectives of this study are describing the reproductive biology of *Palicourea corymbifera* and *P. nitidella* (Rubiaceae) in the Amazon forest understory, and evaluating the roles that flower visitor species and the presence of ants play on pollination and fruit production by these two plant species. Fieldwork was carried out in the forest reserve Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, between November 2014 and January 2016. Flowering of *P. corymbifera* started in June and peaked in September when the first individuals started to fruit, whereas flowering of *P. nitidella* started in September and the fruit season in November. Populations of both plant species presented distyly, but *P. nitidella* included two additional semi-homostylic morphs, named here as “brevistyle variant” (VB) and “longistyle variant” (VL). *Palicourea corymbifera* and *P. nitidella* were self-incompatible, although the variant morphs presented 1 to 2% of fruits produced through geitonogamy. The VB and VL morphs showed peculiar relations of incompatibility between them and with other morphs, once VL was compatible with brevistyle and VB pollen but not compatible with pollen from VL or longistyle morphs. Flowers of the two species were diurnal, tubular and odourless; nectar sugar concentration ranged from 17 to 26%. Hummingbirds, bees and butterflies visited *P. corymbifera* and *P. nitidella* flowers. Based on visiting behaviour and contact with anthers and stigmas, hummingbirds were the main pollinators and some bees were nectar or pollen robbers. Thirteen and ten ant species patrolled and fed on the extrafloral nectaries of *P. corymbifera* and *P. nitidella* inflorescences, respectively. Through experiments with controlled ant presence/absence, fruit set showed increased success in inflorescences with presence of ants than in those with ants absent. However, the composition of flower visitor assemblages and the total number of visits per flower did not significantly differ between inflorescences with presence or absence of ants. On the other hand, visitor assemblages significantly differed between *P. corymbifera* and *P. nitidella* in spite they shared several visitor species. In addition, the total number of bee- and butterfly-visits per flower was higher in *P. nitidella* than in *P. corymbifera* inflorescences, but the number of hummingbird-visits per flower was not different between them. In overall, the presence of ants has no perceptible effects on flower visitor species of *Palicourea* or on their visiting frequencies, thus the increased fruit set in the presence of ants seems to be related to the protection that ants may confer against other herbivores. The high frequency of bees, which are likely less efficient for legitimate pollinations, could explain the occurrence of semi-homostylic morphs in *P. nitidella*.

Sumário

Lista de tabelas	xi
Lista de figuras	vii
Introdução	01
Revisão bibliográfica	04
<i>Estudos de biologia reprodutiva e polinização de Rubiaceae</i>	04
<i>Heterostilia e polinização em Rubiaceae</i>	05
<i>Associação com formigas e sucesso reprodutivo</i>	07
Objetivos	09
<i>Objetivo Geral</i>	09
<i>Objetivos Específicos</i>	09
Material e métodos	09
<i>Local de estudo</i>	09
<i>Espécies focais</i>	10
<i>Fenologia Reprodutiva</i>	11
<i>Morfologia floral</i>	11
<i>Biologia floral</i>	11
<i>Sistema reprodutivo e eficiência da polinização</i>	12
<i>Visitantes florais</i>	13
<i>Associação com formigas</i>	14
<i>Efeito das formigas sobre a composição e a frequência de visitantes</i>	14
Resultados	15
Discussão	47
Conclusões	54
Bibliografia citada	56

Lista de tabelas

- Tabela 1.** Formação de frutos em tratamentos de polinizações controladas em flores longistilas (L) e brevistilas (B) de *Palicourea corymbifera* e *P. nitidella* (Rubiaceae) em floresta de terra firme, Amazônia Central. Letras diferentes junto aos valores de sucesso indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamentos para a mesma espécie (testes z par a par, para igualdade de proporções).....24
- Tabela 2.** Formação de frutos em tratamentos de polinizações controladas em morfos florais variante longistilo (VL) e variante brevistilo (VB), ou em morfos típicos longistilo (L) e brevistilo (B) que receberam pólen de morfos variantes, em plantas de *Palicourea nitidella* (Rubiaceae) em floresta de terra firme, Amazônia Central. Letras diferentes junto aos valores de sucesso indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamentos para a mesma espécie (testes z par a par, para igualdade de proporções).....25
- Tabela 3.** Visitantes florais, número total de visitas, frequência relativa, duração das visitas e número de flores visitadas (média \pm DP) de *Palicourea corymbifera* e *Palicourea nitidella* (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia Central.....26
- Tabela 04.** Espécies de formigas visitantes dos nectários pericárpicos de *Palicourea corymbifera* e *Palicourea nitidella* (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia Central.....30
- Tabela 05.** Visitantes florais, número total de visitas, frequência relativa, duração das visitas e número de flores visitadas (média \pm DP) de *Palicourea corymbifera* e *Palicourea nitidella* (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia Central. Controle - com formiga; Tratamento - sem formiga; n - nº de visitas; s - segundos.....45

Lista de figuras

- Figura 1.** Inflorescência de *Palicourea corymbifera* (A) e *Palicourea nitidella* (B) em sub-bosque de floresta de terra firme, Amazônia Central.....10
- Figura 2.** Porcentagem de indivíduos de *Palicourea corymbifera* (Rubiaceae) em floração (A) e frutificação (B) em sub-bosque de floresta de terra firme, Amazônia Central.....16
- Figura 3.** Porcentagem de indivíduos de *Palicourea nitidella* (Rubiaceae) em floração (A) e frutificação (B) em sub-bosque de floresta de terra firme, Amazônia Central.....16
- Figura 4.** Comprimento do conjunto estilete e estigma, dos estames e das anteras, e distância entre estigma e anteras de flores brevistilas e longistilas de *Palicourea corymbifera* (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia Central.....18
- Figura 5.** Comprimento do tubo floral, diâmetros de abertura e da base da corola e diâmetro do ovário de flores brevistilas e longistilas de *Palicourea corymbifera* (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia Central.....19
- Figura 6.** Esquema das flores de *Palicourea nitidella* em corte longitudinal. A-B) flores tipicamente distílicas (longistila e brevistila). C-D) formas semi-homostílicas (variante brevistila e variante longistila).....20
- Figura 7.** Comprimento do conjunto estilete e estigma, dos estames e das anteras, e distância entre estigma e anteras de flores brevistilas, variantes brevistilas, longistilas e variantes longistilas de *Palicourea nitidella* (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia Central.....20
- Figura 8.** Comprimento do tubo floral, diâmetros de abertura e da base da corola e diâmetro do ovário de flores brevistilas, variantes brevistilas, longistilas e variantes longistilas de *Palicourea nitidella* (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia Central.....21
- Figura 9.** Variação da viabilidade do pólen e da concentração de açúcares no néctar ao longo do dia em dois morfos florais de *Palicourea corymbifera* e quatro morfos florais de *Palicourea nitidella* (Rubiaceae), em floresta de terra firme na Amazônia Central.....22
- Figura 10.** Apodiformes e Lepidoptera visitando flores de *Palicourea corymbifera* e *Palicourea nitidella* na Amazônia. A) *Thalurania furcata* (fêmea); B) *Thalurania furcata* (macho); C) *Phaethornis bourcieri*; D) *Phaethornis superciliosus*; E) *Phaethornis ruber*; F) *Heliconius numata*.....27
- Figura 11.** Hymenoptera visitantes florais de *Palicourea corymbifera* e *Palicourea nitidella* na Amazônia. A-B) *Trigona fulviventris*; C-D) *Trigona williana*; E-F) *Nogueirapis minor*; G-H) *Leurotrigona pusilla*; I-J) *Euglossa decorata*.....28

Figura 12. Aumento da frutificação na presença de formigas calculado pela diferença da proporção de frutos formados entre pares de inflorescências, com formigas e sem formigas, em 13 indivíduos de *Palicourea corymbifera* (A) e 17 indivíduos de *Palicourea nitidella* (B), em floresta de terra firme, Amazônia Central.....32

Figura 13. Similaridade (NMDS e índice de Bray-Curtis) da composição de espécies visitantes entre inflorescências focais de *Palicourea corymbifera* (símbolos pretos) e *Palicourea nitidella* (símbolos vermelhos) com formigas presentes (símbolos preenchidos) ou ausentes (símbolos vazados), em floresta de terra firme, Amazônia Central; (A) inclui todas as espécies de visitantes, (B) inclui apenas espécies de beija flores e (C) inclui apenas espécies de abelhas e borboletas.....33

Figura 14. Mediana e quartis da variação do total de visitas por flor entre inflorescências focais de *Palicourea corymbifera* (Pcory) e *Palicourea nitidella* (Pniti) com formigas ausentes (Pcory_A e Pniti_A) ou presentes (Pcory_P e Pniti_P), em floresta de terra firme, Amazônia Central; (A) visitas de todas as espécies agrupadas, (B) visitas apenas de espécies de beija flores e (C) visitas apenas de espécies de abelhas e borboletas.....34

Introdução

Rubiaceae é uma das maiores famílias de dicotiledôneas, com cerca de 10.700 espécies distribuídas em 637 gêneros e 44 tribos, bastante representativa em sub-bosque de florestas tropicais (Ribeiro *et al.* 1999). *Palicourea* Aubl. (tribo Psychotrieae), foco desse estudo, possui cerca de 200 espécies de arbustos e pequenas árvores distribuídas do México e Caribe até a América do Sul (Taylor 1997). As espécies de Rubiaceae são relativamente especializadas quanto aos polinizadores (Robbrecht 1988, Barrett & Richards 1990) por apresentarem flores tubulares que favorecem visitantes com aparelho bucal alongado, como borboletas, mariposas, abelhas de língua longa e beija-flores, embora também moscas e vespas. Por outro lado, em alguns gêneros, como em *Palicourea*, predomina a polinização por beija-flores (Bawa & Beach 1983, Taylor 1997, Castro & Oliveira 2001). Embora muitas espécies sejam hermafroditas, Rubiaceae se destaca pela diversidade de sistemas sexuais (Bawa & Beach 1983). A apresentação secundária de pólen pelo estilete, a heterostilia e a ocorrência de dioiccia são três estratégias reprodutivas complexas da família (Robbrecht 1988).

Comum em espécies de *Palicourea*, a heterostilia é um tipo de polimorfismo floral geneticamente controlado que promove a polinização cruzada e reduz a autogamia em populações de plantas (Beach & Bawa 1980, Barrett & Richards 1990, Lloyd & Webb 1992). Indivíduos de morfotipos distintos apresentam flores caracterizadas pela diferença recíproca no comprimento de estiletos e estames (hercogamia recíproca). Espécies heterostílicas podem apresentar dois (distilia) ou três (tristilia) morfotipos, sendo mais comum a ocorrência de distilia (Barrett & Richards 1990; Barrett 1992; Kohn & Barrett 1992; Cunha & Fischer 2009; Cunha *et al.* 2014).

Espécies heterostílicas geralmente apresentam incompatibilidade heteromórfica, portanto são dependentes de cruzamentos entre morfotipos recíprocos para a formação de frutos e sementes (Dulberger 1992; Kohn & Barrett 1992). A heterostilia em plantas tropicais pode sofrer modificações evolutivas, como a quebra do sistema caracterizada por meio da substituição da distilia pela homostilia (presença de apenas um morfotipo). A homostilia, nesse caso, é interpretada como resultado da recombinação do supergene da distilia (Barrett & Richards 1990), originados de indivíduos brevistílicos heterozigotos (Richards 1986). Nesse caso, portanto, há conversão de uma população de plantas distílicas, xenógamas e auto-incompatíveis, em população homostílica,

autógama (Hamilton 1990). Rubiaceae está entre as famílias com mais espécies heterostílicas ($n \approx 416$), principalmente nos gêneros *Palicourea*, *Psychotria*, *Bouvardia* e *Guettarda*, tribo Psychotrieae (Bahadur 1968; Sobrevila *et al.* 1983; Barrett & Richards 1990; Hamilton 1990). Embora o gênero *Palicourea* seja quase exclusivamente heterostílico, a homostilia tem sido reportada para algumas espécies, como para populações de *Palicourea* cf. *virens* na Amazônia (Santos *et al.* 2008), para *P. alpina*, *P. macrobotrys* e *P. coriacea* (Tanner 1982; Coelho & Barbosa 2003; Consolaro *et al.* 2009).

A interação com polinizadores desempenha importante papel na manutenção do sistema distílico em função da dependência de fluxo de pólen intermorfo. O desequilíbrio dessa interação pode exercer pressões seletivas a favor da quebra do supergene (Ganders 1979). A interação planta-polinizador pode ser afetada por perturbações ambientais, tamanho populacional reduzido, reprodução clonal e isolamento geográfico (Barrett 1977, 1988; Washitani *et al.* 1994; Kéry *et al.* 2000; Cunha & Fischer 2009; Cunha *et al.* 2014). Diversos estudos sobre biologia floral, sistemas de reprodução e polinização têm contribuído para a compreensão do sucesso adaptativo, fluxo gênico, variabilidade genética e dos mecanismos de especiação em plantas (Bawa *et al.* 1985; Faegri & Pijl 1979; Maruyama *et al.* 2010; Valois-Cuesta *et al.* 2011; Rodrigues 2013; Cunha *et al.* 2014).

Além da interação com polinizadores, muitas espécies de plantas apresentam interações mutualistas com formigas (mirmecofilia). Estudos têm evidenciado que a maior abundância e diversidade de associações entre plantas e formigas são encontradas em regiões tropicais (Rico-Gray & Oliveira 2007). As formigas são abundantes na maioria dos ecossistemas terrestres e apresentam vários tipos de interações com um grande número de espécies, incluindo as plantas (Hölldobler & Wilson 1990), que ofertam alimento e/ou abrigo em troca da defesa contra herbívoros pelas formigas (Rico-Gray & Oliveira 2007). Os nectários extraflorais (NEFs) são estruturas que promovem a atração de formigas que, por sua vez, atacam herbívoros que chegam à planta, com efeito positivo para o crescimento ou reprodução das plantas (Horvitz & Schemske 1984; Del-Claro *et al.* 1996; Oliveira *et al.* 1999; Santos & Del-Claro 2001; Suzuki *et al.* 2004; Nascimento & Del-Claro 2010). Entretanto, outros estudos não evidenciaram essa relação positiva (O'Dowd & Catchpole 1983; Rasbrook *et al.* 1992).

Associações com formigas são comuns em Rubiaceae, ocorrem em cerca de 140 espécies de 22 gêneros. As Rubiaceae mirmecófilas são predominantemente distribuídas

no sudeste da Ásia, especialmente na Malásia, com poucas espécies na África continental e região Neotropical (Razafimandimbison *et al.* 2005). As formigas são encontradas principalmente em ramos ocos, usados como abrigo. Algumas espécies, como *Duroia saccifera*, podem apresentar domáceas evidentes na base das folhas (Ribeiro *et al.* 1999). A disposição de NEFs em diferentes estruturas da planta pode determinar diferenças de eficiência de patrulhamento pelas formigas, e assim em proteção diferencial entre estruturas com maior ou menor quantidade de NEFs (Leal *et al.* 2006). Em algumas espécies de Rubiaceae, e particularmente em *Palicourea*, é comum a presença de formigas em inflorescências e infrutescências. Há espécies em que o ovário torna-se exposto após a queda da corola e mantém funcional o disco nectarífero da base do cálice, são os chamados nectários pericárpicos pós-florais (Del-Claro *et al.* 2013). Os nectários pericárpicos pós-florais têm sido frequentemente tratado na literatura como NEFs, isso se deve a suas semelhanças morfológicas e funcionais em atrair formigas para proteger a planta contra herbívoros (Del-Claro *et al.* 2013).

Interações entre formigas e plantas são comuns, mas pouco tem sido estudado quanto aos possíveis efeitos da presença delas sobre a polinização e o sucesso reprodutivo de plantas. Apesar de estudos não reportarem efeito da presença de formigas sobre visitantes florais em *Palicourea*, ou em Rubiaceae de modo geral, as formigas podem também conferir proteção contra pilhadores de néctar floral, conforme observado em *Passiflora coccinea* (Passifloraceae) (Leal *et al.* 2006), as formigas parecem não interferir nas visitas de beija-flores polinizadores, entretanto podem impedir borboletas pilhadoras de pousarem nas flores (Leal *et al.* 2006).

Revisão Bibliográfica

Estudos de biologia reprodutiva e polinização de Rubiaceae

As angiospermas possuem flores com grande variação de tamanhos, cores e formas, características associadas aos diferentes modos de polinização (Faegri & Pijl 1979; Endress 1994; Proctor *et al.* 1996). Animais visitantes de flores apresentam adaptações morfológicas e comportamentais que permitem a exploração de recursos florais (Proctor *et al.* 1996).

As interações planta-polinizadores dependem da biologia das espécies envolvidas, tais como morfologia e biologia floral e fenologia (Faegri & Van der Pijl 1979; Proctor *et al.* 1996). Estudos de biologia reprodutiva de plantas permitem compreender os mecanismos evolutivos e ecológicos que atuam nas interações entre populações de animais e plantas (Barbosa 1997; Bawa *et al.* 1989; Faegri & Van der Pijl 1980; Feinsinger 1983). As espécies de Rubiaceae apresentam um amplo espectro de polinizadores e sistemas de reprodução (Robbrecht 1988, Barrett & Richards 1990). As características florais tornam a família atrativa a diversas espécies de animais antófilos. Dentre espécies de Rubiaceae conhecidas quanto aos polinizadores, *Psychotria barbiflora* na Mata Atlântica, é melitófila e polinizada por três espécies de abelhas que coletam néctar e pólen e uma espécie de vespa que consome néctar (Teixeira 2001).

Por outro lado, as flores de *Sabicea cinerea* são polinizadas pelo beija-flor *Phaethornis ruber*, ao passo que outro beija-flor, *Amazilia* sp., atua como pilhador (Teixeira 2001). Além dos beija-flores, várias espécies de abelhas (Apidae, Anthophoridae, Halictidae), borboletas (Hesperiidae, Nymphalidae) e moscas (Syrphidae) visitavam as flores de *Sabicea cinerea*. A variedade de visitantes entre as duas espécies, demonstra uma grande diversidade de possíveis polinizadores. As flores de *Randia itatiaiae* (Rubiaceae) são visitadas por Hesperiidae durante o dia e por Sphingidae e Noctuidae durante a noite, e ambos os grupos são equivalentes quanto ao papel para a formação de frutos e sementes, embora Hesperiidae sejam mais frequentes que os outros visitantes (Ávila Jr & Freitas 2011). *Guihaiothamnus acaulis* (Rubiaceae) apresenta características florais para polinização por borboletas, porém os principais polinizadores são mosca-das-flores (hoverflies) e abelhas Halictidae (Xie *et al.* 2012).

Três espécies de *Retiniphyllum* (Rubiaceae) florescem durante o ano todo em vegetação de campinarana na Amazônia Central, com grande sobreposição na produção de flores e de visitantes – abelhas, beija-flores, borboletas e mariposas (Schwade 2010). *Psychotria spectabilis* e *Palicourea* cf. *virens* florescem de setembro a dezembro e de maio a outubro, respectivamente, na região de Manaus. As flores oferecem néctar e são polinizadas pelos beija-flores *Phaethornis bourcieri* e *Thalurania furcata*; abelhas *Trigona fulviventris* atuam como pilhadoras (Santos *et al.* 2008).

Heterostilia e polinização em Rubiaceae

A heterostilia está presente em cerca de 25 famílias de angiospermas, sendo Rubiaceae a que possui mais gêneros com esse polimorfismo (Ganders 1979; Barrett 1992; Kohn & Barrett 1992). Segundo Andersson (1992), a heterostilia surgiu a partir de espécies protândricas e auto-compatíveis. A partir de mutação surgiu um alelo dominante que produziu flores com alelos GG e Gg auto-compatíveis. O alelo mutante teria então passado por seleção natural, surgindo indivíduos com flores recessivas gg que deram origem às plantas longistílicas e alógamas.

A distilia é comum em Psychotrieae e considerada uma característica primitiva, de modo que outros sistemas reprodutivos presentes são considerados uma variação evolutiva da distilia (Hamilton 1990). A distilia é caracterizada pela ocorrência de dois morfos florais, longistilo com estigma localizado acima do nível das anteras e o brevistilo com estigma localizado abaixo do nível das anteras. Esses morfos tendem a ocorrer em isopletia (razão 1:1) nas populações, que geralmente apresentam incompatibilidade intramorfo (Barrett 1992; Kohn & Barrett 1992).

Devido a questões ecológicas e evolutivas, como o desequilíbrio na relação planta polinizador e quebra ou permutação do supergene, a estrutura floral e a frequência dos morfos pode variar, podendo ocorrer a perda de um dos morfos. Esse monomorfismo ocorre por rearranjo na disposição dos verticilos reprodutivos de modo que eles fiquem na mesma altura (Ganders 1979). Essas modificações intraespecíficas podem ocorrer em diferentes níveis, entre flores de um único indivíduo, entre indivíduos de uma população ou entre populações distintas (Baker 1966; Ganders 1979; Hamilton 1990).

Ganders (1975) encontrou populações distílicas e homostílicas de *Mitchella repens* na América do Norte e constatou a ocorrência de autoincompatibilidade intramorfo nas populações distílicas, assim como nas populações homostílicas. Barrett

& Richards (1990) revisaram a heterostilia em plantas tropicais e reportaram uma variedade de modificações evolutivas, entre elas a substituição da distília em vários gêneros de Rubiaceae e a quebra da polinização cruzada para autopolinização associada à homostilia. As características florais de *Manettia cordifolia* indicam a ocorrência de monomorfismo longistilo provavelmente derivado de ancestral distílico (Consolaro *et al.* 2005).

Sakai & Wright (2008) registraram monomorfismo longistilo em população de *Psychotria hoffmannseggiana* na América Central, porém Teixeira & Machado (2004) encontraram população distílica dessa espécie em Mata Atlântica. *Manettia luteo-rubra*, por outro lado, apresenta populações perfeitamente distílicas, com hercogamia recíproca, isoplelia e incompatibilidade intramorfo; suas flores são polinizadas por beija-flores e visitadas também por borboletas *Heliconius* spp. (Passos & Sazima 1995).

No sudeste goiano, há descrição de população monomórfica e autocompatível de *Psychotria goyazensis* (Rodrigues & Consolaro 2013). Em *Psychotria carthagenensis*, espécie amplamente distribuída no Brasil, também há registro de população monomórfica no triângulo mineiro, e registros de populações homostílicas e distílicas típicas em outras regiões (Koch *et al.* 2010; Consolaro *et al.* 2011; Faria *et al.* 2012). Na Mata Atlântica, *Psychotria nuda* não apresenta hercogamia exatamente recíproca, entretanto experimentos mostraram semelhanças com o sistema reprodutivo de espécies distílicas (Castro & Araújo 2004). Rodrigues (2013) estudou a reprodução de oito espécies de *Psychotria* e encontrou incompatibilidade e isoplelia em espécies distílicas típicas, autocompatibilidade em espécies monomórficas, e anisoplelia e monomorfismo em espécies distílicas atípicas. A hercogamia recíproca entre os morfos não ocorreu de forma perfeita, mas houve alta reciprocidade em populações distílicas.

Embora grande parte das angiospermas seja generalista quanto aos polinizadores, a distília requer um sistema de polinização preciso e especializado. Mesmo assim há casos de espécies heterostílicas e generalistas (Maruyama *et al.* 2010). *Faramea cyanea* (Rubiaceae) é distílica com características para polinização noturna, mas suas flores são visitadas por abelhas diurnas e por mariposas de hábitos noturnos, e ambos os grupos contribuem igualmente para a polinização legítima (intermorfo). Embora *F. cyanea* não apresente hercogamia recíproca exata entre morfos, a polinização e o sucesso reprodutivo não são prejudicados (Maruyama *et al.* 2010). Em *Psychotria suerrensii* (Rubiaceae) abelhas e borboletas transferem quantidades

similares de pólen, entretanto as abelhas são mais eficientes na transferência entre os morfos (Judy & Stone 1996).

A produção e a disponibilidade de néctar e a taxa de visitação são semelhantes entre os morfos da distílica *Palicourea demissa* (Rubiaceae), e a frequência de deposição de pólen legítimo é positivamente relacionada à produção de néctar (Valois-Cuesta *et al.* 2011). Essa espécie apresenta fluxo assimétrico de pólen, onde flores longistilas são mais eficazes que as brevistilas em dispersar pólen para os estigmas legítimos, em contrapartida as flores brevistilas são mais eficazes em receber pólen legítimo e produziram mais frutos e sementes viáveis (Valois-Cuesta *et al.* 2012).

Associação com formigas e sucesso reprodutivo

A ação de herbívoros é uma força seletiva sobre os mecanismos de defesa nas plantas, o que leva ao desenvolvimento de estratégias contra a herbivoria (Croteau *et al.* 2000). As defesas podem ser química (presença de látex, alcalóides, glicosídeos, taninos ou outras substâncias que conferem toxicidade ou impalatabilidade) ou física (presença de tricomas, espinhos e outras modificações morfológicas) (Gullan & Cranston 1994; Marquis & Braker 1994; Agrawal & Rutter 1998; Croteau *et al.* 2000). Há ainda defesas obtidas a partir da associação com outras espécies, principalmente com formigas predadoras de herbívoros (Del-Claro *et al.* 1996; Vesprini *et al.* 2003; Del-Claro 2004). Nas interações com formigas mutualistas condicionais, as plantas podem oferecer local para nidificação (domáceas, ramos ocos) e/ou alimento (nectários extraflorais, corpúsculos nutritivos ou exsudações) (Janzen 1966). A importância das formigas para as plantas pode ser associada à redução ou exclusão de herbívoros consumidores de tecidos vegetativos ou reprodutivos (Bentley 1977; Oliveira *et al.* 2002).

Efeitos indiretos da herbivoria foliar como o atraso da floração, a redução da quantidade e tamanho das flores e a redução da quantidade ou qualidade do recurso oferecido aos polinizadores, podem comprometer o sucesso reprodutivo (Quesada *et al.* 1995; Mutikainen & Delph 1996; Strauss *et al.* 1996). A herbivoria floral pode levar ao comprometimento da reprodução, afetando diretamente a aptidão da planta (Karban & Strauss 1993; Cunningham 1995; Johnson *et al.* 1995; Lohman *et al.* 1996; Mothershead & Marquis 2000; Canela & Sazima 2003; Riba-Hernandez & Stoner 2005).

Em *Pityrocarpa moniliformis* (Leguminosae: Mimosoideae), espécie entomófila generalista, formigas *Camponotus* associadas exibem comportamento agonístico contra

abelhas e vespas, mas não contra borboletas e moscas visitantes de flores (Ferreira 2009). A redução do tempo de visitas por *Apis mellifera* em presença das formigas contribui para redução da geitonogamia e aumento dos níveis de polinização cruzada (Ferreira 2009).

Em *Passiflora coccinea* (Passifloraceae), o papel de proteção oferecido pelas formigas contra pilhadores aumentou a disponibilidade de néctar para os polinizadores que visitaram mais vezes as flores e aumentaram os níveis de deposição de pólen sobre os estigmas, resultando em aumento do número de sementes por fruto (Fischer & Leal 2006; Leal *et al.* 2006). Em algumas espécies de Rubiaceae, como em *Palicourea macrobotrys* o acesso de pilhadores às flores foi reduzido na presença de formigas nas inflorescências (Coelho e Barbosa 2003), fato que também foi observado em *Palicourea rigida* (Silva 1995).

Em *Tocoyena formosa*, plantas com formigas apresentaram frutos maiores, mais frutos por botão e menos herbívoros (Santos & Del-Claro 2001). Várias espécies de Rubiaceae que ocorrem na Reserva Ducke apresentam associação com formigas, dentre elas, espécies de *Duroia* e *Remijia* (Taylor *et al.* 2007). Del-Claro *et al.* (2013) estudaram *Palicourea rigida* (Rubiaceae) e encontraram que a corola se desprende após a polinização e os nectários florais passam a atuar como nectários extraflorais que atraem formigas. A partir de experimentos de exclusão, constataram que plantas com formigas perderam menos área foliar e tinham frutos maiores que as plantas isoladas de formigas. Outros experimentos apontam que a produtividade é maior em plantas com presença de formigas (Costa *et al.* 1992; Del-Claro *et al.* 1996; Oliveira 1997).

Objetivos

Objetivo Geral

Descrever a biologia reprodutiva e avaliar o papel de visitantes florais e da presença de formigas sobre o sucesso reprodutivo de *Palicourea corymbifera* (Müll. Arg.) Standl. e *P. nitidella* (Muell. Arg.) Standl. (Rubiaceae), em sub-bosque de floresta de terra firme na Amazônia Central.

Objetivos Específicos

- (a) descrever a fenologia de floração e frutificação, a morfologia e a biologia floral;
- (b) avaliar o sistema reprodutivo e a eficiência dos polinizadores em condições naturais;
- (c) descrever a frequência e o comportamento das espécies de visitantes florais e a frequência de espécies de formigas presentes nas inflorescências;
- (d) avaliar o efeito da presença de formigas sobre a frequência de polinizadores às flores e sobre o sucesso de frutificação e produção de sementes.

Material e Métodos

Local de estudo

O estudo foi realizado em floresta de terra firme, na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD) (02° 55' 48" S, 59° 58' 32" W), administrada pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) desde 1963 (Ribeiro *et al.* 1999). A RFAD compreende área de 10 000 ha, sendo 90% representada por vegetação primária (Prance 1990) contígua à floresta amazônica a leste e a norte, mas cercada por áreas alteradas nos limites sul e oeste.

O clima da região é do tipo Afi de Köppen com baixa sazonalidade (Ribeiro 1976). A pluviosidade média varia de 1750 a 2500 mm (Oliveira 2008), com período mais seco entre agosto e outubro. A temperatura média anual é de aproximadamente 26 °C e a umidade relativa do ar varia de 75 a 86% (Marques-Filho *et al.* 1981). A

vegetação é classificada pelo IBGE como floresta ombrófila densa de terras baixas, por estar situada em altitudes de 30 a 110 m acima do nível do mar.

Os solos são pobres em nutrientes, e variam desde argilosos nas porções mais altas e planas (platôs) até arenosos nas porções mais baixas (baixios) (Costa *et al.* 2008). São conhecidas aproximadamente 2300 espécies de plantas vasculares na RFAD, agrupadas em 510 gêneros e 112 famílias (Prance 1990; Ribeiro *et al.* 1999).

Espécies focais

Palicourea corymbifera apresenta hábito arbóreo com até 7 m de altura, com folhas verticiladas, pecioladas, e com ápice acuminado. Ocorre na Guiana Francesa, Venezuela, e Brasil, na região amazônica. Na Reserva Ducke, é encontrada em floresta de platô e vertente (Taylor *et al.* 2007), com floração ocorrente de setembro a dezembro e com frutos de dezembro a março (Campos & Brito 1999). As inflorescências são corimbiformes, alaranjadas ou amareladas, as flores apresentam corola amarela, acastanhada ou rosada e são tubulares (Figura 1A), os frutos são drupas elipsoides.

Palicourea nitidella é uma arvoreta com até 2 m de altura. Ocorre na Venezuela, Colômbia, Peru e Brasil, nos estados da região amazônica (Taylor *et al.* 2007). Na Reserva Ducke, foi encontrada em baixio, capoeira e campinarana, com floração em agosto e de outubro a dezembro (Campos & Brito 1999). Suas folhas são opostas, pecioladas com ápice agudo ou acuminado, as inflorescências são corimbiformes e de cor vermelha, com flores de cálice curto-denteado, a corola é vermelha ou róseo-avermelhada às vezes com lobos brancos ou amarelos (Figura 1B), seus frutos também são drupas. Um espécime testemunho de *P. corymbifera* e *P. nitidella* foram depositados no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sob os registros N° 272630/272631.



Figura 1. Inflorescência de *Palicourea corymbifera* (A) e *Palicourea nitidella* (B) em sub-bosque de floresta de terra firme, Amazônia Central.

Fenologia reprodutiva

Para registrar a fenologia de floração e frutificação, 27 indivíduos de *P. corymbifera* e 31 de *P. nitidella* foram selecionados ao longo de trilhas preexistentes em platôs e baixios da floresta, mantendo distância mínima de 10 m entre as plantas selecionadas. Esses indivíduos foram marcados com fitas plásticas e visitados mensalmente, entre novembro de 2014 e janeiro de 2016. Foram registradas as fenofases: botões, flores abertas, frutos imaturos e frutos maduros.

Para a avaliação das fenofases foi utilizado o índice de atividade, que consiste no registro de presença ou ausência de determinada fenofase (Bencke & Morellato 2002). Esse índice indica a percentagem de indivíduos na população que está manifestando determinado evento fenológico e a sincronia entre os indivíduos da população, quanto maior o número de indivíduos manifestando a mesma fenofase no mesmo intervalo de tempo, maior é a sincronia dessa população (Morellato *et al.* 1990; Bencke & Morellato 2002). Foi considerado evento fenológico não sincrônico ou assincrônico: < 20% de indivíduos na fenofase; pouco sincrônico ou sincronia baixa: 20-60% de indivíduos na fenofase e sincronia alta: > 60% de indivíduos na fenofase (Bencke & Morellato 2002).

Morfologia floral

Observações sobre a morfologia floral de *P. corymbifera* e *P. nitidella* foram realizadas em flores frescas no campo e em laboratório. As avaliações da morfometria floral foram realizadas em 30 flores brevistilas e em 45 longistilas de *P. corymbifera*, e em 25 flores de cada um dos quatro morfos de *P. nitidella*. Com auxílio de paquímetro (precisão de 0,5 mm) e estereomicroscópio, foram mensuradas as seguintes variáveis: altura do conjunto estilete e estigma, comprimento dos estames, comprimento das anteras, distância estigma-anteras, comprimento do tubo floral, diâmetro do tubo da corola (abertura e base) e o diâmetro do ovário. Possíveis diferenças entre os morfos quanto às medidas das flores foram avaliadas com uso de teste-t entre os dois morfos de *P. corymbifera* e análise de variância (ANOVA) e testes de Tukey *a posteriori* entre os quatro morfos de *P. nitidella*, com auxílio do programa Systat 11 (Wilkinson 2004).

Biologia floral

Para estudo da biologia floral foram utilizadas três flores de 20 indivíduos de cada espécie, totalizando 60 flores. Por meio de observações diretas e auxílio de lupa de mão, foram registrados o horário e a sequência de abertura das estruturas da flor, a

duração das flores, a deiscência das anteras, a liberação de pólen e a receptividade estigmática, que foi testada com peróxido de hidrogênio (Dafni 1992).

A presença de osmóforos foi testada, utilizando-se a técnica de coloração com vermelho neutro (Dafni 1992) em 20 flores previamente ensacadas com tecido voile, coletadas de 20 indivíduos de cada espécie. Logo após o início da antese as flores foram imersas em solução durante 15 min e depois lavadas com água e analisadas quanto às regiões coradas para determinação da presença de locais de emissão de odor. As regiões coradas de vermelho intenso indicam a localização das células produtoras de odor.

A viabilidade polínica foi estimada durante o período de antese, por meio da coleta de pólen em 36 flores dos dois morfos de *P. corymbifera*, de um total de 12 indivíduos, e em 51 flores dos quatro morfos de *P. nitidella*, em 17 indivíduos. As flores foram previamente ensacadas com sacos de tecido voile e a cada três horas, foram coletadas três flores de diferentes inflorescências no mesmo indivíduo. Em laboratório foram confeccionadas lâminas com o pólen das flores coletadas, e adicionado carmim acético 2% (Radford *et al.* 1974) para corar os grãos viáveis, e contabilizados 500 grãos de pólen por lâmina, pelo método de varredura, utilizando um microscópio óptico binocular com lente objetiva de 10x. A porcentagem de grãos viáveis foi obtida pela equação: Viabilidade do pólen (%) = N° de grãos corados / N° de grãos contados * 100.

A porcentagem de açúcares do néctar foi avaliada em 36 flores dos dois morfos de *P. corymbifera*, de um total de 12 indivíduos, e em 57 flores dos quatro morfos de *P. nitidella*, em 19 indivíduos. Flores em pré-antese foram ensacadas com tecido voile para evitar os visitantes florais e as medições foram realizadas do início ao final da antese em intervalos de três horas. A extração do néctar foi feita com microseringas e a porcentagem de açúcares foi mensurada com o auxílio de refratômetro portátil com escala de 0 a 90% Brix.

Sistema reprodutivo e eficiência da polinização

Para estudo do sistema reprodutivo foram feitos experimentos de polinizações controladas em 20 indivíduos de *P. corymbifera* e 35 indivíduos de *P. nitidella*. Os tratamentos foram (a) autopolinização espontânea, por meio de flores ensacadas que impediam acesso aos visitantes; (b) autopolinização manual, por meio de polinização manual com o pólen da própria flor; (c) geitonogamia, por meio de polinização manual com pólen proveniente de outras flores do mesmo indivíduo; (d) polinização cruzada ilegítima (intramorfo; B x B e L x L) e (e) polinização cruzada legítima (intermorfo; B x

L e L x B), por meio de polinização manual com pólen proveniente de outro indivíduo, distante pelo menos 200 m da planta receptora. No caso de *P. nitidella*, além dos cruzamentos entre os morfos tipicamente distílicos, foi realizado também o cruzamento entre os morfos variante longistilo (VL) e variante brevistilo (VB) e entre os típicos e os variantes; (f) polinização natural, por meio de flores identificadas e disponíveis aos visitantes, sem manipulação.

Para a realização dos experimentos, as inflorescências foram previamente isoladas com sacos de tecido voile, e as flores polinizadas foram marcadas com linhas de crochê coloridas (cada cor correspondendo a um tipo de polinização). As polinizações manuais foram realizadas no período da manhã entre 0700 e 1000 h, e após os tratamentos as inflorescências permaneceram ensacadas, até a queda da corola. Posteriormente as plantas foram visitadas quinzenalmente para registro dos frutos formados, tanto para os tratamentos como para o controle e os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste Z, no programa Systat 11 (Wilkinson 2004). Para os experimentos de polinização cruzada intra e intermorfos, as flores receberam uma mistura de pólen de três plantas doadoras do mesmo morfotipo.

Visitantes florais

Para registro da frequência e do comportamento dos visitantes florais das duas espécies de *Palicourea*, foram realizadas observações diretas, com vista desarmada ou auxílio de binóculo, registros fotográficos e filmagens, utilizando câmera GoPro (Hero 3). As observações foram realizadas em 10 plantas de cada espécie entre 0600 e 1800 h, com um total de 120 horas de observações para cada espécie. Foram também registrados o horário das visitas individuais a inflorescências focais, o local de contato do corpo dos visitantes com anteras e estigmas, a duração de cada visita e o número de flores visitadas nas inflorescências focais. O papel das espécies de visitantes como polinizadores foi inferido com base no comportamento ao explorar flores, contato com estruturas reprodutivas da flor e frequência de visitas. A identificação das aves foi realizada por meio de documentação fotográfica e de filmagens, além das observações diretas no campo e confirmação com especialista. Os insetos visitantes foram identificados por meio de coleta de indivíduos e posterior envio a especialistas. Espécimes testemunhos dos insetos foram depositados na Coleção entomológica do INPA, onde o nº de tombamento não se aplica.

Associação com formigas

Para testar efeito das formigas sobre a frequência de visitantes florais (polinizadores e pilhadores) e sobre a formação de frutos, foram selecionados 10 indivíduos de cada espécie de *Palicourea* e marcadas duas inflorescências em cada planta. Uma inflorescência foi isolada das formigas com resina Tanglefoot® enquanto a outra inflorescência permaneceu acessível às formigas, perfazendo dois tratamentos: inflorescências com formigas e inflorescências sem formigas. Nas inflorescências com formigas, a frequência, a abundância e o conjunto de espécies de formigas foram registrados em censos de 5 min com intervalos de uma hora ao longo do período de antese. As observações foram realizadas entre 0600 e 1800 h, com uma total de 120 horas para cada espécie. Ao final de cada censo, alguns indivíduos das espécies de formigas foram coletados, fixados em álcool 70% e posteriormente encaminhados a especialistas para identificação. Durante as observações foram registrados o comportamento das formigas na presença e na ausência de visitantes florais, as espécies de visitantes florais, a frequência e a duração das visitas. Ao final da estação de floração, as inflorescências utilizadas no experimento foram inspecionadas para amostragem de frutos formados. Para testar se a quantidade de frutos formados difere entre inflorescências com formigas presentes e inflorescências com formigas ausentes foi usado z igualdade de proporções, por meio do programa Systat 11 (Wilkinson 2004).

Efeito das formigas sobre a composição e a frequência de visitantes

Para avaliar se a presença de formigas influencia a composição e a frequência relativa de espécies de visitantes florais foi usada Análise de Similaridades (ANOSIM; índice de similaridade de Bray-Curtis; 10.000 permutações) entre inflorescências focais dos dois tratamentos (presença de formigas e ausência de formigas) de ambas as espécies de *Palicourea*. O conjunto de visitantes foi determinado com base nos registros de visitas de cada espécie visitante às inflorescências focais, sendo que a frequência foi considerada como o número de visitas realizadas dividido pelo total de flores abertas na inflorescência. Para visualização da similaridade dos conjuntos de visitantes florais entre inflorescências foi utilizado método de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS; índice de similaridade de Bray-Curtis).

Adicionalmente, para avaliar se o total global de visitas recebidas por flor varia entre inflorescências com formigas e inflorescências sem formigas de ambas as plantas, foi usado teste Kruskal-Wallis para comparações entre os quatro tipos de inflorescências

(*P. corymbifera* com formigas, *P. corymbifera* sem formigas, *P. nitidella* com formigas e *P. nitidella* sem formigas) e teste Mann-Whitney para comparações par a par entre os tratamentos. Uma vez que a presença de formigas pode influenciar de modo diferente os visitantes que pairam (beija-flores) e os que pousam (abelhas e borboletas) nas inflorescências, as análises foram repetidas para cada grupo separadamente, com auxílio do programa Past (Hammer *et al.* 2001).

Resultados

Fenologia reprodutiva

Palicourea corymbifera floresceu entre junho e dezembro, com pico em setembro (Figura 2A). A espécie apresentou um alto grau de sincronismo entre indivíduos no período de pico de floração, e menor sincronismo nos meses iniciais e finais de floração. O início da frutificação ocorreu entre setembro e abril, com pico de indivíduos com frutos imaturos em dezembro e pico de frutos maduros em fevereiro (Figura 2B). O número de frutos imaturos e maduros foi reduzindo gradualmente, à medida que as infrutescências se desprendem dos ramos. *Palicourea nitidella* floresceu a partir de junho, com apenas um indivíduo em flor, e a partir de setembro outros indivíduos iniciaram a floração, que atingiu pico em novembro e dezembro (Figura 3A), nesses meses ocorreu a maior intensidade de flores em antese, 83% em 2014 e 62% em 2015 (Figura 3A). A frutificação de *P. nitidella* iniciou em novembro e, conforme registrado no ano anterior (2014), se estende até abril. Os indivíduos apresentaram maior porcentagem de frutos imaturos (97%) em janeiro e de frutos maduros em fevereiro (79%) (Figura 3B).

Morfologia floral

Palicourea corymbifera e *P. nitidella* apresentaram inflorescências do tipo corimbo e flores tubulares, actinomorfas, gamopétalas, pentâmeras, isostêmones, hermafroditas e heterostílicas. *Palicourea corymbifera* apresentou corola amarela e *P. nitidella* corola vermelha ou róseo-avermelhada com lobos brancos. As flores de *P. corymbifera* e *P. nitidella* apresentam ovário ínfero bilocular, com um óvulo por lóculo, disco nectarífero acima do ovário e envolto por anel de tricomas. As flores de ambas as espécies geralmente apresentaram cinco estames, mas algumas no mesmo indivíduo apresentaram seis.

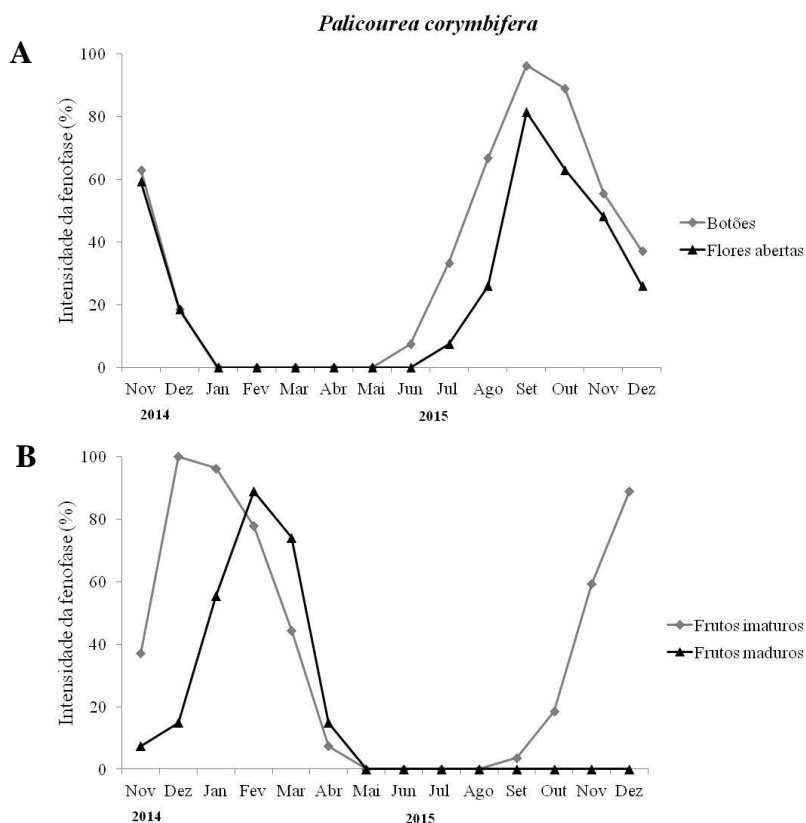


Figura 2. Porcentagem de indivíduos de *Palicourea corymbifera* (Rubiaceae) em floração (A) e frutificação (B) em sub-bosque de floresta de terra firme, Amazônia Central.

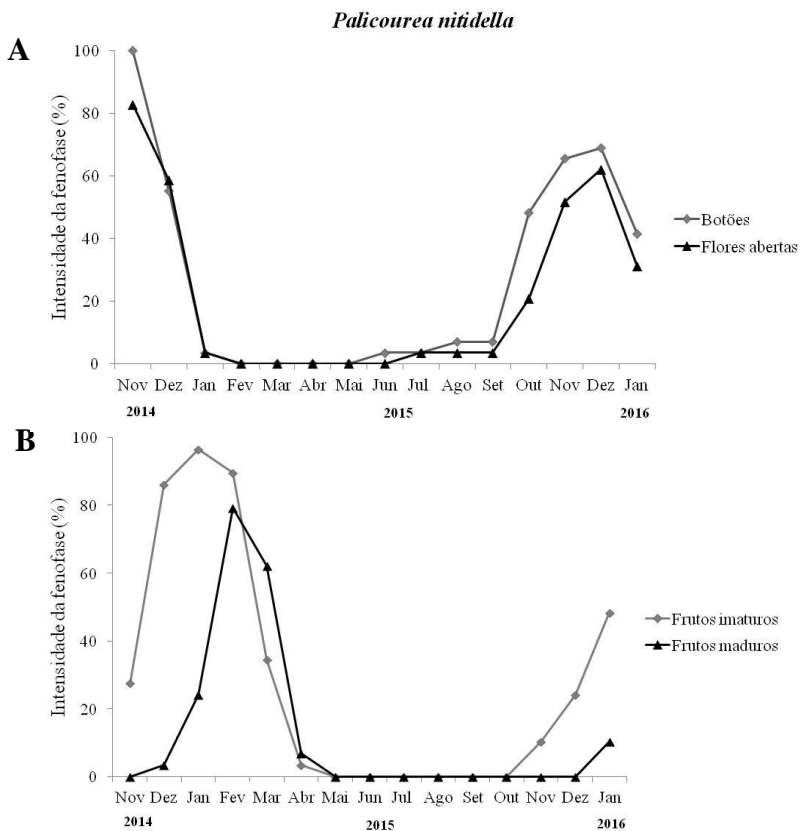


Figura 3. Porcentagem de indivíduos de *Palicourea nitidella* (Rubiaceae) em floração (A) e frutificação (B) em sub-bosque de floresta de terra firme, Amazônia Central.

Os filetes são fundidos até a porção mediana com o tubo da corola; as anteras são dorsifixas, bitecas e possuem deiscência longitudinal. Em ambas as espécies, o estigma em geral é bifido, mas por vezes podem ser tripartido. A quantidade de flores abertas por inflorescência por dia variou de 7 a 50 ($13 \pm 9,9$; $n = 24$) em *P. corymbifera*, e de 1 a 15 ($4 \pm 3,0$; $n = 24$) em *P. nitidella*. Adicionalmente, *P. corymbifera* produziu em média $358 \pm 167,8$ flores por inflorescência ($n = 24$) e *P. nitidella*, $76 \pm 25,1$ ($n = 24$), com média de $16 \pm 12,4$ ($n = 26$) e $4 \pm 1,2$ ($n = 31$) inflorescências, respectivamente para cada espécie.

Palicourea corymbifera apresentou distília, e razão de 1:1,5 entre plantas brevistilas e longistilas no local de estudo. O comprimento do conjunto estilete e estigma foi maior em flores longistilas do que brevistilas ($p < 0,01$; $t = -3,114$; $gl = 73$), ao passo que o comprimento dos estames foi maior em flores brevistilas que longistilas ($p < 0,001$; $t = 4,819$; $gl = 73$) (Figura 4). Entre os morfos de *P. corymbifera*, não houve diferença ($p = 0,10$; $t = 1,678$; $gl = 73$) quanto ao comprimento das anteras, porém a distância estigma-antenas foi menor ($p < 0,001$; $t = -3,559$; $gl = 73$) em flores brevistilas que longistilas (Figura 4). O comprimento do tubo floral não diferiu entre os morfos ($p = 0,38$; $t = 0,892$; $gl = 73$), assim como o diâmetro da abertura ($p = 0,77$; $t = 0,294$; $gl = 73$) e da base ($p = 0,38$; $t = 0,886$; $gl = 73$) das flores. Porém, o diâmetro do ovário foi maior ($p < 0,01$; $t = 3,128$; $gl = 73$) em flores brevistilas que longistilas de *P. corymbifera* (Figura 5).

Palicourea nitidella, por sua vez, apresentou dois morfos típicos brevistilo e longistilo, além de duas formas semi-homostílicas (Figura 6), nomeadas aqui “variante brevistilo” e “variante longistilo” com base na posição do estigma inferior ou superior às antenas, respectivamente. O comprimento do conjunto estilete e estigma foi maior em flores longistilas típicas ($p < 0,001$; $F_{3-96} = 30,554$; ANOVA e Tukey a posteriori) e não diferiu entre os outros três morfos (p variou de 0,99 a 1,00 em comparações par a par) (Figura 7). Por outro lado, o comprimento dos estames foi maior em flores brevistilas que nos demais morfos ($p < 0,01$; $F_{3-96} = 20,927$; ANOVA e Tukey a posteriori), não apresentou diferença entre os morfos longistilo e variante brevistilo ($p = 0,78$), e foi menor em flores variantes longistilas que nos demais morfos ($P < 0,01$). O mesmo padrão foi encontrado para o comprimento das antenas, maior para o morfo brevistilo ($p < 0,001$; $F_{3-96} = 24,768$; ANOVA e Tukey a posteriori), semelhante entre os morfos longistilo e variante brevistilo ($p = 0,97$) e menor em flores variantes longistilas ($P < 0,01$) (Figura 6). Houve diferença ($p < 0,001$; $F_{3-96} = 145,078$; ANOVA) entre os quatro morfos quanto à

distância que separa o estigma das anteras. Dentre os dois morfos heterostílicos típicos, à distância estigma-anteras foi menor ($p < 0,001$; Tukey a posteriori) em flores brevistilas. Entretanto, os dois morfos florais variantes apresentaram distância estigma-anteras muito menores ($p < 0,001$; Tukey a posteriori) que os morfos heterostílicos típicos, e não houve diferença quanto a essa distância entre os morfos variante brevistilo e variante longistilo ($p = 0,952$; Tukey a posteriori) (Figura 7).

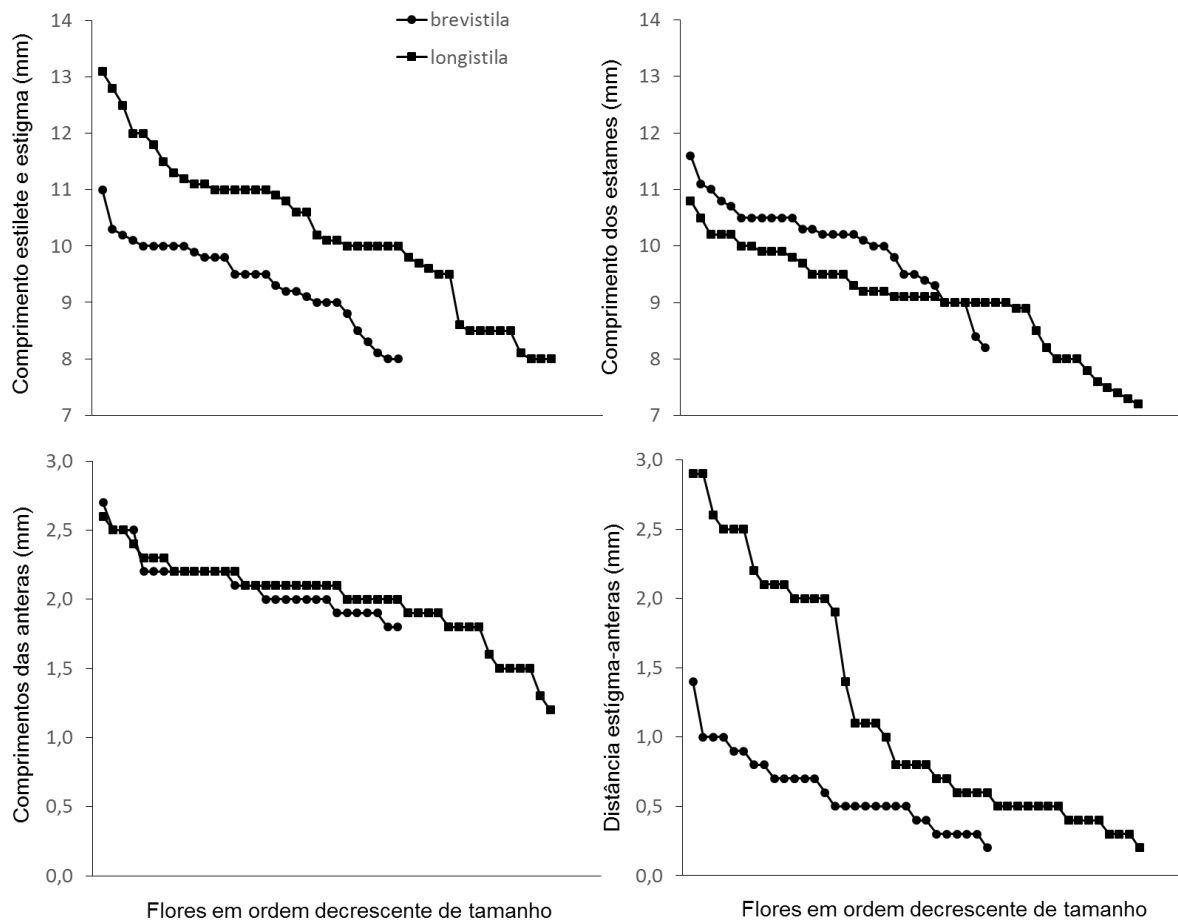


Figura 4. Comprimento do conjunto estilete e estigma, dos estames e das anteras, e distância entre estigma e anteras de flores brevistilas e longistilas de *Palicourea corymbifera* (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia Central.

Em *P. nitidella*, o comprimento do tubo floral de ambos os morfos variantes foi mais curto que dos morfos brevistilo e longistilo típicos ($p < 0,001$; $F_{3-96} = 19,302$; ANOVA e Tukey a posteriori), mas não houve diferenças entre os dois morfos variantes ($p = 0,46$; teste Tukey a posteriori) ou entre os dois morfos típicos ($p = 0,99$; teste Tukey a posteriori) (Figura 8). O diâmetro da abertura da corola de flores brevistilas foi

maior que de flores variantes brevistilas ($p < 0,01$; $F_{3-96} = 4,906$; ANOVA e Tukey a posteriori); porém não diferiu entre flores longistilas e variantes longistilas ($p = 0,68$; teste Tukey a posteriori), ou entre esses morfos e os tipos brevistilos (Figura 8). O diâmetro da base da corola não diferiu entre os quatro tipos florais ($p = 0,08$; $F_{3-96} = 2,350$; ANOVA). O diâmetro do ovário de flores longistilas foi maior que de flores variantes longistilas ($p < 0,01$; teste Tukey a posteriori), mas não houve diferenças ($p = 0,13$ a $0,99$; teste Tukey a posteriori) em comparações par a par entre outros tipos florais (Figura 8).

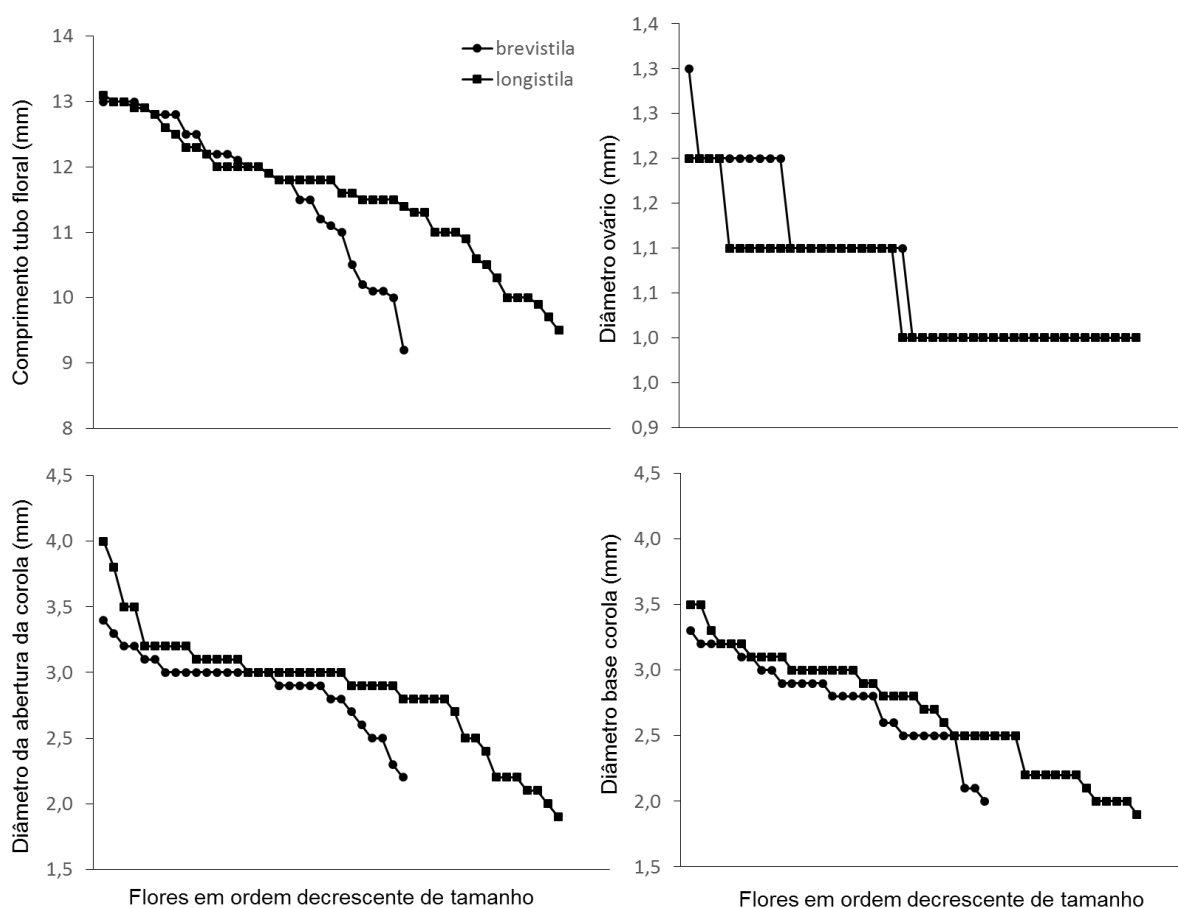


Figura 5. Comprimento do tubo floral, diâmetros de abertura e da base da corola e diâmetro do ovário de flores brevistilas e longistilas de *Palicourea corymbifera* (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia Central.

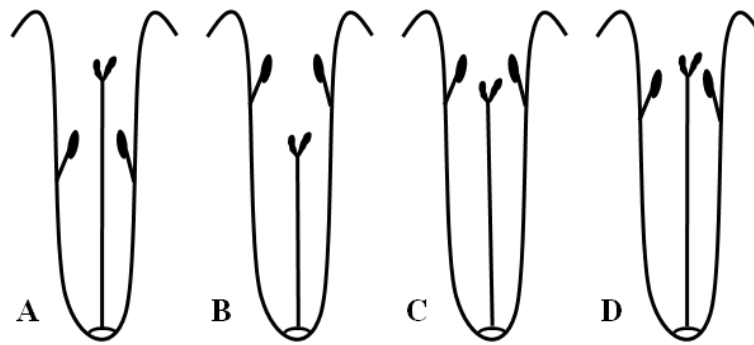


Figura 6. Esquema das flores de *Palicourea nitidella* em corte longitudinal. A-B) flores tipicamente distílicas (longistila e brevistila). C-D) formas semi-homostílicas (variante brevistila e variante longistila).

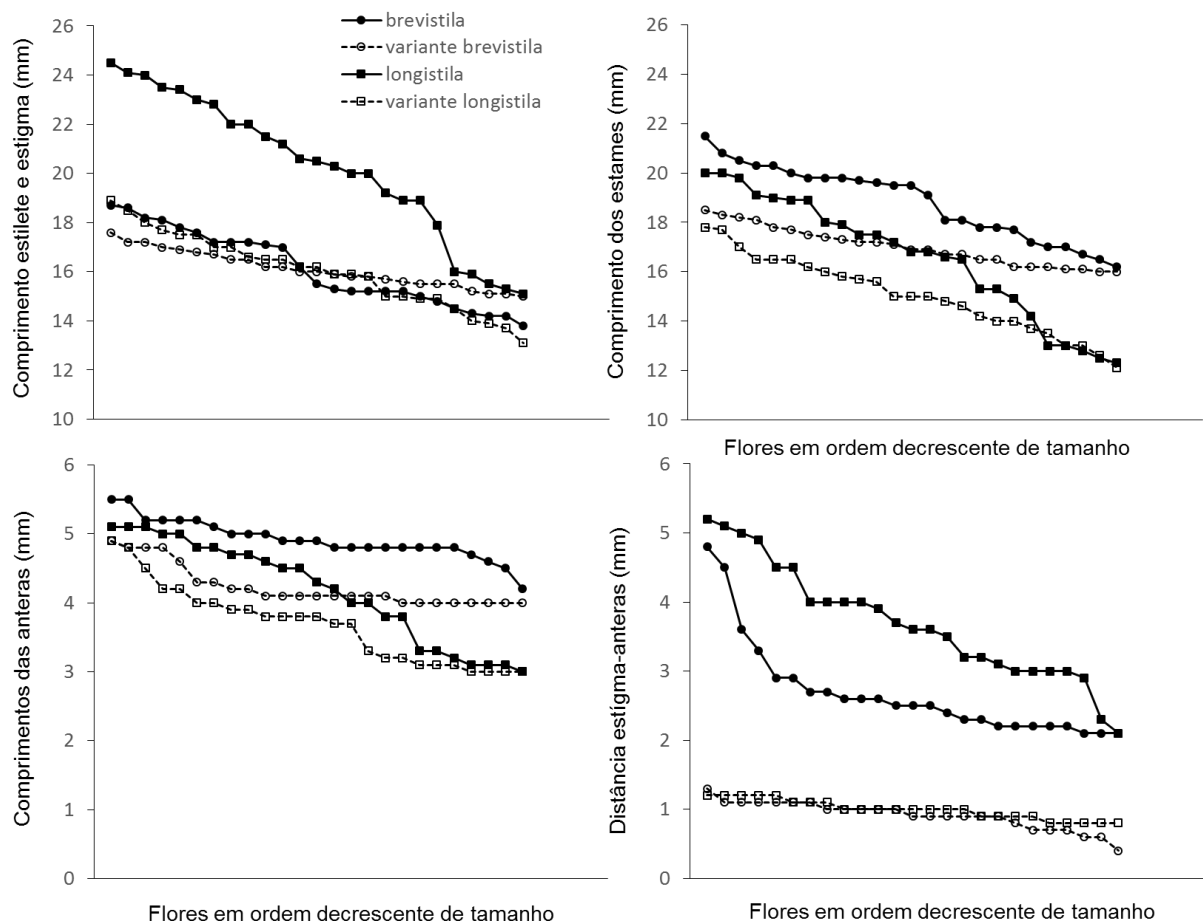


Figura 7. Comprimento do conjunto estilete e estigma, dos estames e das anteras, e distância entre estigma e anteras de flores brevistilas, variantes brevistilas, longistilas e variantes longistilas de *Palicourea nitidella* (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia Central.

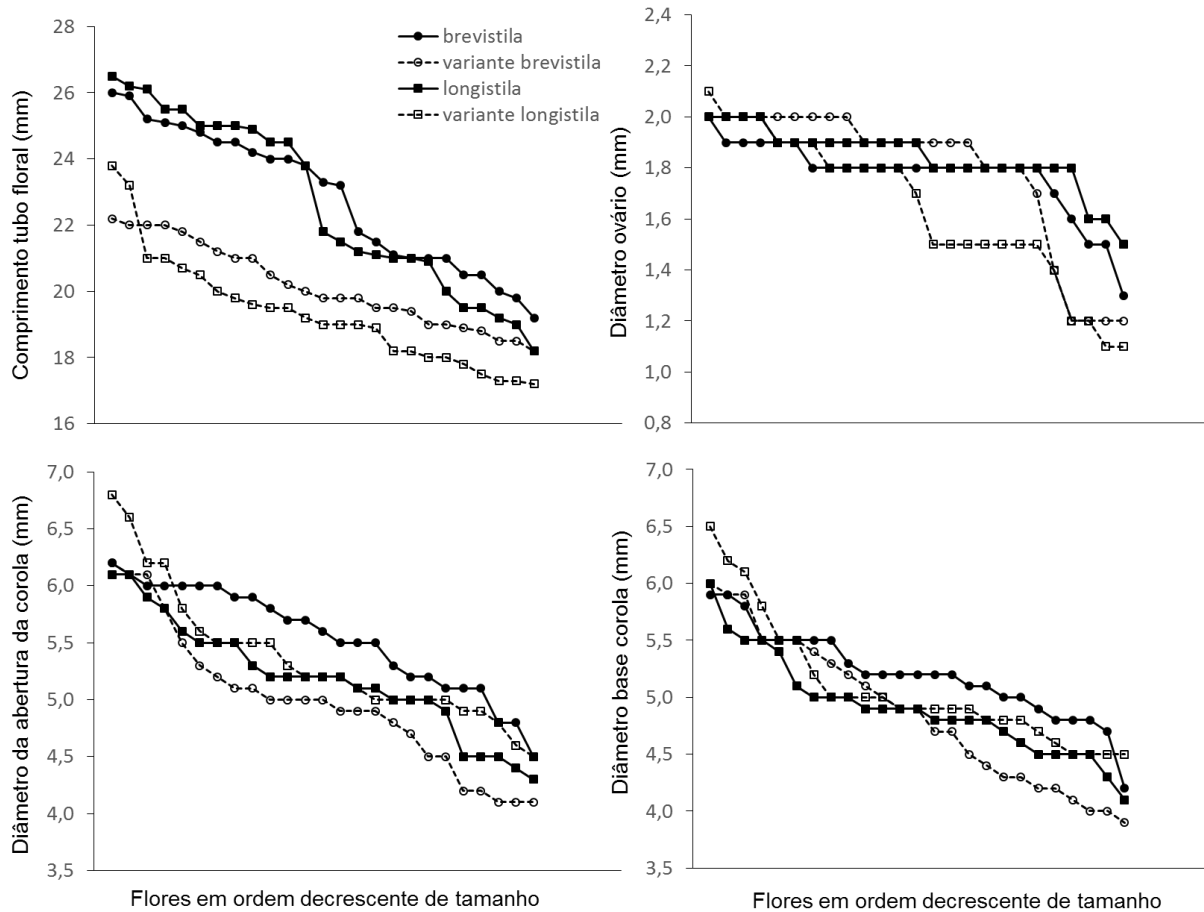


Figura 8. Comprimento do tubo floral, diâmetros de abertura e da base da corola e diâmetro do ovário de flores brevistilas, variantes brevistilas, longistilas e variantes longistilas de *Palicourea nitidella* (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia Central.

Biologia floral

As flores de *P. corymbifera* e *P. nitidella* apresentaram duração de um dia e antese crepuscular diurna, com início da abertura entre 0400 e 0530 h, até estarem totalmente abertas por volta de 0600 h. Em ambas as espécies, a corola iniciava a murcha a partir de 1400 h e a abscisão ocorria por volta de 1800 h, permanecendo na planta apenas o ovário e o disco nectarífero exposto. A receptividade dos estigmas de *P. corymbifera* e *P. nitidella* iniciou antes da abertura das flores, por volta de 0400 h. Não foi detectado odor nas flores de ambas as espécies.

Em *P. corymbifera*, a viabilidade polínica foi mais alta no início da manhã e decresceu até o final da antese, tanto para flores longistilas ($n = 18$) como brevistilas ($n = 18$) (Figura 9). Em *P. nitidella* a viabilidade polínica ao longo do dia não seguiu o mesmo padrão observado para *P. corymbifera*. O pico de grãos viáveis em *P. nitidella*

ocorreu antes em flores longistilas (0900 h) ($n = 15$) que brevistilas (1200 h) ($n = 12$), ao passo que flores variantes longistilas ($n = 12$) e variantes brevistilas ($n = 12$) apresentaram pico no início da manhã (0600 h) (Figura 9). O néctar foi produzido continuamente no decorrer do dia pelas flores de ambas as espécies. Em *P. corymbifera*, a concentração de açúcares no néctar foi $18,5 \pm 0,6\%$ ($n = 18$) para flores longistilas e $19,5 \pm 0,2\%$ ($n = 18$) para flores brevistilas; um pico de concentração do néctar (1200 h) ocorreu para flores longistilas e dois picos (0600 e 1500 h) ocorreram para flores brevistilas (Figura 9). Em *P. nitidella*, a concentração média de açúcares no néctar foi de $23,0 \pm 0,6\%$ ($n = 15$) entre flores longistilas, de $23,7 \pm 0,6\%$ ($n = 15$) para flores brevistilas, de $25,9 \pm 0,8\%$ ($n = 15$) para variantes longistilas e de $24,0 \pm 0,4\%$ ($n = 12$) entre variantes brevistilas (Figura 9). A concentração máxima do néctar ocorreu as 0600 h para flores longistilas e as 1800 h para as brevistilas; para flores variantes longistilas e variantes brevistilas o pico ocorreu 0900h e 1200 h, respectivamente (Figura 9).

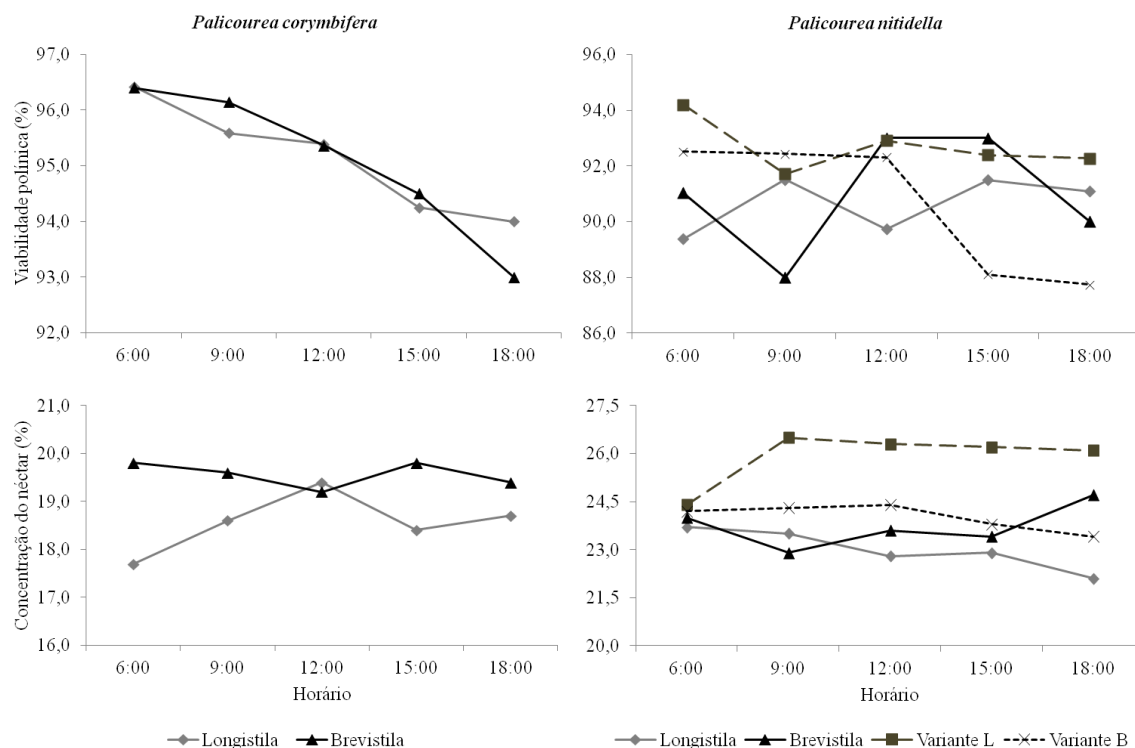


Figura 9. Variação da viabilidade do pólen e da concentração de açúcares no néctar ao longo do dia em dois morfos florais de *Palicourea corymbifera* e quatro morfos florais de *Palicourea nitidella* (Rubiaceae), em floresta de terra firme na Amazônia Central.

Sistema reprodutivo

Os tratamentos de autopolinização espontânea e autopolinização manual, com pólen da mesma flor ou de flores diferentes da mesma planta (geitonogamia), não formaram frutos para os morfos florais brevistilo e longistilo, nas duas espécies estudadas, *P. corymbifera* e *P. nitidella* (Tabela 1). Adicionalmente, para essas duas espécies, as flores brevistilas e longistilas submetidas à polinização manual ilegítima (entre indivíduos do mesmo morfo) também não formaram frutos. Apenas os tratamentos de polinização legítima (entre indivíduos de morfos diferentes) e polinização natural apresentaram formação de frutos. A proporção de frutos formados via polinizações manuais legítimas não diferiu ($p = 0,94$; $z = 0,075$) entre os morfos de *P. corymbifera*, assim como não diferiu entre os tratamentos de polinização manual legítima e polinização natural (Tabela 1). Por outro lado, a proporção de frutos formados via polinizações legítimas foi quase duas vezes maior ($p < 0,01$; $z = -2,949$) em plantas brevistilas do que em plantas longistilas de *P. nitidella*, porém não houve diferença ($p = 0,11$; $z = -1,579$) entre esses morfos no tratamento de polinização natural. Além disso, não houve diferença da proporção de frutos formados entre os tratamentos de polinização legítima e natural para flores brevistilas ($p = 0,18$; $z = 1,328$) ou longistilas ($p = 0,69$; $z = 0,397$) de *P. nitidella* (Tabela 1).

Nos experimentos de polinização envolvendo os morfos florais variantes de *P. nitidella* também não ocorreu formação de frutos via autopolinização espontânea e autopolinização com pólen da mesma flor, para ambos os morfos variantes; entretanto, houve 1 a 2% de sucesso via geitonogamia (Tabela 2). Nos tratamentos de polinização cruzada, a formação de frutos pelo morfo variante longistilo ocorreu com sucesso semelhante entre tratamentos com pólen dos morfos brevistilo, longistilo e variante brevistilo, porém não houve sucesso com pólen do mesmo morfo (Tabela 2). Por outro lado, o morfo variante brevistilo obteve sucesso de formação de frutos com pólen de flores longistilas e variantes longistilas, em contraste com a proporção insignificante de frutos via pólen de flores brevistilas ou variantes brevistilas. Dentre os dois morfos heterostílicos típicos, as flores longistilas apresentaram baixo (3%) ou nenhum sucesso de frutificação, ao passo que flores brevistilas apresentaram 17% de sucesso, com pólen dos morfos variantes (Tabela 2). Em condições de polinização natural, os morfos variantes apresentaram sucesso semelhante entre si, assim como apresentaram sucesso semelhante entre esse tratamento e os tratamentos de polinização cruzada que obtiveram

mais sucesso. Adicionalmente, o sucesso de frutificação via polinização natural foram semelhantes entre os quatro morfos de *P. nitidella* (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Formação de frutos em tratamentos de polinizações controladas em flores longistilas (L) e brevistilas (B) de *Palicourea corymbifera* e *P. nitidella* (Rubiaceae) em floresta de terra firme, Amazônia Central. Letras diferentes junto aos valores de sucesso indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamentos para a mesma espécie (testes z par a par, para igualdade de proporções).

Espécie	Tratamento	Morfo	Flores (n)	Frutos (n)	Sucesso (%)
<i>Palicourea corymbifera</i>	Autopolinização espontânea	L	72	0	0 ^a
		B	48	0	0 ^a
	Autopolinização manual (pólen da própria flor)	L	72	0	0 ^a
		B	48	0	0 ^a
	Autopolinização manual (geitonogamia)	L	72	0	0 ^a
		B	48	0	0 ^a
	Polinização manual cruzada legítima	L	72	31	43 ^b
		B	48	21	44 ^b
	Polinização manual cruzada ilegítima	L	72	0	0 ^a
		B	48	0	0 ^a
Polinização natural	L	72	35	49 ^b	
	B	48	19	40 ^b	
<i>Palicourea nitidella</i>	Autopolinização espontânea	L	120	0	0 ^a
		B	30	0	0 ^a
	Autopolinização manual (pólen da própria flor)	L	120	0	0 ^a
		B	30	0	0 ^a
	Autopolinização manual (geitonogamia)	L	120	0	0 ^a
		B	30	0	0 ^a
	Polinização manual cruzada legítima	L	120	48	40 ^b
		B	30	21	70 ^c
	Polinização manual cruzada ilegítima	L	120	0	0 ^a
		B	30	0	0 ^a
Polinização natural	L	120	45	38 ^b	
	B	30	16	53 ^{b, c}	

Visitantes florais

As flores de *P. corymbifera* e *P. nitidella* foram visitadas por beija-flores, borboletas e abelhas (Tabela 3). As visitas às flores ocorreram entre 0600 e 1800 h, sendo mais intensas no período da manhã do que durante a tarde, quando as flores apresentavam pouco néctar e pólen. *Palicourea corymbifera* e *P. nitidella* foram visitadas pelos beijas flores *Thalurania furcata* (Figura 10A;10B), *Phaethornis bourcierii* (Figura 10C) e *Ph. superciliosus* (Figura 10D); além de *Ph. ruber* (Figura

10E) que visitou apenas a segunda espécie (Tabela 3). Os beija-flores iniciavam as visitas a partir das 0600 h e foram mais frequentes durante a manhã que à tarde; a partir das 1500 h houve poucas ou nenhuma visita. As quatro espécies de beija-flores realizaram visitas legítimas às flores. *Thalurania furcata* foi o principal visitante de *P. corymbifera*, sendo as fêmeas (Figura 10A) mais frequentes que os machos dessa espécie (Tabela 3). *Phaethornis bourcieri* foi o mais frequente em *P. nitidella*, com frequência relativa de 4,5%. Durante as visitas os beija-flores inseriam o bico na flor para a coleta de néctar, e contatavam o estigma e as anteras. Os grãos de pólen ficavam aderidos em diferentes regiões do bico, dependendo do morfotipo floral. A cada turno de visitação, os beija-flores visitavam todas as flores abertas de todas as inflorescências da planta, antes de se dirigirem para outra planta.

Tabela 2. Formação de frutos em tratamentos de polinizações controladas em morfos florais variante longistilo (VL) e variante brevistilo (VB), ou em morfos típicos longistilo (L) e brevistilo (B) que receberam pólen de morfos variantes, em plantas de *Palicourea nitidella* (Rubiaceae) em floresta de terra firme, Amazônia Central. Letras diferentes junto aos valores de sucesso indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamentos para a mesma espécie (testes z par a par, para igualdade de proporções).

Tratamento	Morfo		Flores (n)	Frutos (n)	Sucesso (%)
	receptor	doador			
Autopolinização espontânea	VL	-	42	0	0 ^a
	VB	-	42	0	0 ^a
Autopolinização manual (pólen da própria flor)	VL	-	42	0	0 ^a
	VB	-	42	0	0 ^a
Autopolinização manual (geitonogamia)	VL	-	84	1	1 ^a
	VB	-	84	2	2 ^a
Polinização manual cruzada	VL	B	42	24	57 ^e
	VL	L	42	23	55 ^{d,e}
	VL	VL	42	0	0 ^a
	VL	VB	42	18	43 ^{c,d,e}
	VB	B	42	1	2 ^{a,b}
	VB	L	42	19	45 ^{c,d,e}
	VB	VB	42	1	2 ^{a,b}
	VB	VL	42	17	41 ^{c,d,e}
	L	VL	80	0	0 ^a
	L	VB	80	2	3 ^a
Polinização natural	B	VB	12	2	17 ^{b,c}
	B	VL	12	2	17 ^{b,c}
Polinização natural	VL	-	42	23	55 ^{d,e}
	VB	-	42	15	36 ^{c,d}

Tabela 3. Visitantes florais, número total de visitas, frequência relativa, duração das visitas e número de flores visitadas (média ± DP) de *Palicourea corymbifera* e *Palicourea nitidella* (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia Central.

Espécie	Visitantes florais	Visitas (n)	Frequência Relativa (%)	Duração da visita (s)	Flores visitadas
<i>Palicourea corymbifera</i>	Apodiformes				
	<i>Phaethornis bourcieri</i> (Lesson, 1832)	28	3,75	7,96 ± (4,02)	7,68 ± (4,10)
	<i>Phaethornis superciliosus</i> (Linnaeus, 1766)	5	0,67	7,00 ± (2,45)	7,00 ± (2,83)
	<i>Thalurania furcata</i> (Gmelin, 1788) (fêmea)	51	6,84	7,53 ± (3,78)	6,90 ± (3,64)
	<i>Thalurania furcata</i> (Gmelin, 1788) (macho)	19	2,55	7,74 ± (4,98)	7,00 ± (4,56)
	Hymenoptera				
	<i>Euglossa decorata</i> (Smith, 1874)	4	0,54	21,25 ± (13,15)	1,75 ± (0,50)
	<i>Leurotrigona pusilla</i> (Moure e Carmago, 1987)	108	14,48	20,46 ± (11,80)	1,08 ± (0,36)
	<i>Nogueirapis minor</i> (Moure e Carmago, 1982)	5	0,67	24,00 ± (10,15)	1,00 ± (0,00)
	<i>Trigona fulviventris</i> (Guérin, 1835)	445	59,65	40,37 ± (38,64)	1,75 ± (1,42)
	<i>Trigona williana</i> (Friese, 1900)	35	4,69	30,20 ± (20,63)	1,71 ± (1,05)
	Lepidoptera				
	<i>Heliconius numata</i> var <i>silvana</i> (Stoll, 1781)	45	6,03	24,80 ± (18,45)	1,75 ± (0,87)
	<i>Hyalothyrus infernalis</i> (Möschler, 1877)	1	0,13	-	-
<i>Palicourea nitidella</i>	Apodiformes				
	<i>Phaethornis bourcieri</i> (Lesson, 1832)	32	4,53	4,34 ± (2,48)	4,13 ± (2,34)
	<i>Phaethornis ruber</i> (Linnaeus, 1758)	11	1,56	3,18 ± (1,78)	3,09 ± (1,87)
	<i>Phaethornis superciliosus</i> (Linnaeus, 1766)	10	1,42	3,80 ± (1,62)	3,70 ± (1,77)
	<i>Thalurania furcata</i> (Gmelin, 1788) (fêmea)	13	1,84	6,23 ± (4,53)	5,31 ± (3,20)
	<i>Thalurania furcata</i> (Gmelin, 1788) (macho)	4	0,57	5,75 ± (2,5)	5,5 ± (2,89)
	Hymenoptera				
	<i>Leurotrigona pusilla</i> (Moure e Carmago, 1987)	98	13,88	21,04 ± (12,65)	1,06 ± (0,32)
	<i>Trigona fulviventris</i> (Guérin, 1835)	406	57,51	35,18 ± (27,16)	1,30 ± (0,83)
	<i>Trigona williana</i> (Friese, 1900)	82	11,61	47,32 ± (42,89)	2,06 ± (1,64)
	Lepidoptera				
<i>Heliconius numata</i> var <i>silvana</i> (Stoll, 1781)	34	4,82	36,12 ± (26,65)	1,91 ± (2,40)	
<i>Hyalothyrus infernalis</i> (Möschler, 1877)	16	2,27	14,13 ± (9,02)	1,31 ± (0,48)	

Dois espécies de borboletas, *Heliconius numata* (var. *silvana*) (Figura 10F) e *Hyalothyrus infernalis* também visitaram as flores de ambas as espécies de *Palicourea*. *Heliconius numata* foi mais frequentes que *Hy. infernalis*, mas apresentaram comportamento semelhante. Essas borboletas pousavam na inflorescência e inseriam a probóscide no tubo floral para alcançar o néctar. Os grãos de pólen ficavam aderidos a

probóscide. As borboletas, na maioria das vezes, visitavam apenas duas ou três flores de uma inflorescência e a seguir deslocavam-se para outra planta.



Figura 10. Apodiformes e Lepidoptera visitando flores de *Palicourea corymbifera* e *Palicourea nitidella* na Amazônia. A) *Thalurania furcata* (fêmea); B) *Thalurania furcata* (macho); C) *Phaethornis bourcierii*; D) *Phaethornis superciliosus*; E) *Phaethornis ruber*; F) *Heliconius numata*.

Abelhas *Trigona fulviventris* (Figura 11A;11B) foram os visitantes mais comuns em flores de ambas às espécies de *Palicourea* (Tabela 3). Iniciavam a coleta de pólen e o consumo de néctar por volta das 0600 h e permaneciam ativas durante todo o dia, até mesmo após as 1800 h havia alguns indivíduos forrageando sobre as flores. As abelhas permaneciam longos períodos na mesma planta e suas visitas duravam $40,4 \pm 38,6$ s. Apresentavam comportamento de pilhagem, uma vez que perfuravam a base da flor para acessar o néctar e perfuravam tecidos do ápice da flor para a coleta de pólen, muitas vezes danificando as estruturas florais.

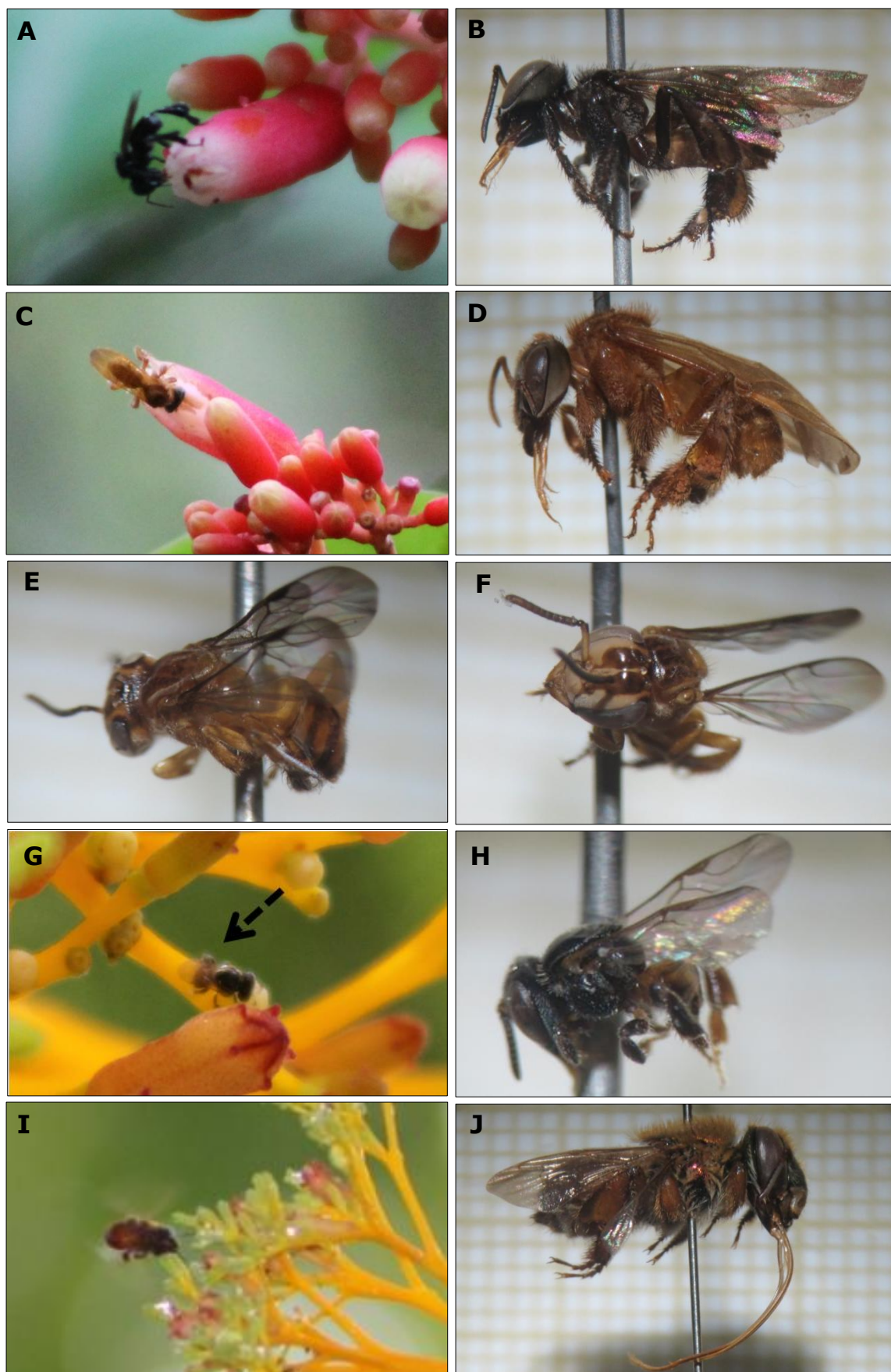


Figura 11. Hymenoptera visitantes florais de *Palicourea corymbifera* e *Palicourea nitidella* na Amazônia. A-B) *Trigona fulviventris*; C-D) *Trigona williana*; E-F) *Nogueirapis minor*; G-H) *Leurotrigona pusilla*; I-J) *Euglossa decorata*.

Durante as visitas para coleta de pólen, *T. fulviventris* inseria o corpo na porção superior da flor e grãos de pólen ficavam aderidos nas regiões ventral e dorsal do tórax e da cabeça, principalmente entre as antenas. Outras duas espécies de abelhas, *Trigona williana* (Figura 11C;11D) e *Nogueirapis minor* (Figura 11E;11F), apresentaram o mesmo comportamento que *T. fulviventris* nas flores das espécies de *Palicourea*, mas foram infrequentes (Tabela 3).

Leurotrigona pusilla (Figura 11G;11H) foi à segunda espécie de abelha mais frequente em flores de ambas as espécies de *Palicourea*. Iniciava as visitas por volta de 0800 h, e finalizavam por volta de 1700 h. Durante as visitas entravam completamente no tubo floral e permaneciam $21,0 \pm 12,6$ s, período em que coletavam pólen e possivelmente também consumiam néctar. Algumas vezes, *L. pusilla* também foi observada visitando os nectários pericárpicos. Foi verificado grãos de pólen aderidos nas regiões ventral e dorsal do tórax de *L. pusilla*. Adicionalmente, abelhas *Euglossa decorata* (Figura 11I;11J) visitaram flores de *P. corymbifera* ocasionalmente. Essas abelhas inseriam a longa probóscide no interior da flor para coleta de néctar; foram encontrados alguns grãos de pólen aderidos na região da cabeça entre as antenas. *Euglossa decorata* visitava várias flores em diferentes inflorescências do mesmo indivíduo, antes de dirigir-se a outra planta.

Associação com formigas

Dezenove espécies de formigas de cinco subfamílias de Formicidae visitaram inflorescências e nectários pericárpicos de *P. corymbifera* ou *P. nitidella* (Tabela 4). As espécies mais abundantes e frequentes em *P. corymbifera* foram *Crematogaster tenuicula* e *C. brasiliensis* com 32,0% (n = 60) e 13,9% (n = 26), respectivamente (Tabela 4). *Crematogaster tenuicula* também foi a espécie mais frequente em *P. nitidella*, representando cerca de 23,6% (n = 63), seguida por *Ectatomma tuberculatum* com 21,7% (n = 58) (Tabela 4), mas *Solenopsis loretana* foi a mais abundante (Tabela 4). As formigas estavam presentes em todos os estádios de desenvolvimento das inflorescências, desde o aparecimento dos botões e principalmente na fase de flores em antese. À medida que as partes florais caíam, deixavam expostos os nectários pericárpicos ativos, atraindo as formigas, presentes durante todo o dia. Em geral as formigas passavam a maior parte do tempo consumindo néctar, ou deslocavam-se entre as flores da inflorescência.

Tabela 04. Espécies de formigas visitantes dos nectários pericárpicos de *Palicourea corymbifera* e *Palicourea nitidella* (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia Central.

Espécie	Espécie de formiga	Frequência <i>n</i> (%)	Abundância <i>n</i> (%)
<i>Palicourea corymbifera</i>	DOLICHODERINAE		
	<i>Tapinoma</i> sp.	13 (6,95)	41 (2,32)
	ECTATOMMINAE		
	<i>Ectatomma tuberculatum</i>	11 (5,88)	16 (0,90)
	FORMICINAE		
	<i>Camponotus balzani</i>	5 (2,67)	5 (0,28)
	<i>Camponotus crassus</i> cf.	12 (6,42)	39 (2,20)
	<i>Camponotus fastigatus</i>	3 (1,60)	5 (0,28)
	<i>Camponotus femoratus</i>	7 (3,74)	8 (0,45)
	MYRMICINAE		
	<i>Cephalotes oculatus</i>	12 (6,42)	22 (1,24)
	<i>Crematogaster erecta</i>	11 (5,88)	64 (3,62)
	<i>Crematogaster brasiliensis</i>	26 (13,90)	786 (44,43)
	<i>Crematogaster tenuicula</i>	60 (32,09)	567 (32,05)
	<i>Solenopsis loretana</i> cf.	12 (6,42)	195 (11,02)
PSEUDOMYRMECINAE			
<i>Pseudomyrmex ita</i>	10 (5,35)	16 (0,90)	
<i>Pseudomyrmex oculatus</i>	5 (2,67)	5 (0,28)	
<i>Palicourea nitidella</i>	DOLICHODERINAE		
	<i>Azteca</i> sp.	39 (14,61)	118 (4,63)
	ECTATOMMINAE		
	<i>Ectatomma tuberculatum</i>	58 (21,72)	120 (4,71)
	FORMICINAE		
	<i>Camponotus latangulus</i>	13 (4,87)	56 (2,20)
	<i>Camponotus femoratus</i>	23 (8,61)	52 (2,04)
	MYRMICINAE		
	<i>Crematogaster brasiliensis</i>	23 (8,61)	127 (4,99)
	<i>Crematogaster carinata</i>	16 (5,99)	199 (7,81)
	<i>Crematogaster tenuicula</i>	63 (23,60)	528 (20,73)
<i>Ochetomyrmex semipolitus</i>	8 (3,00)	26 (1,02)	
<i>Solenopsis brevicornis</i> cf.	13 (4,87)	1309 (51,39)	
PSEUDOMYRMECINAE			
<i>Pseudomyrmex oculatus</i>	11 (4,12)	12 (0,47)	

Dentre 19 espécies de formigas encontradas nas duas espécies de *Palicourea*, somente *Ectatomma tuberculatum* e *Camponotus femoratus* mostraram agressividade contra outros visitantes florais. Por vezes as abelhas visitantes sobrevoavam as flores e desistiam da visita devido à presença dessas formigas, ou quando pousavam, as formigas se deslocavam até elas e atacavam, afugentando as abelhas. As demais espécies de formigas não atacavam os visitantes florais, contudo a simples movimentação das formigas na inflorescência fazia com que borboletas e abelhas (visitantes que pousam nas flores) levantassem voo, para retornarem à flor em seguida ou deixavam a inflorescência.

Durante experimento com inflorescências controladas quanto à presença ou ausência de formigas foram registradas 745 visitas às inflorescências de *P. corymbifera* e 706 visitas às de *P. nitidella*, incluindo beija-flores, borboletas e abelhas. Em *P. corymbifera* ocorreram 361 visitas em inflorescências com formigas e 384 em inflorescências isoladas de formigas, enquanto em *P. nitidella* ocorreram 315 e 391 visitas, respectivamente (Tabela 5), a duração das visitas e o número de flores visitadas não variou muito, entre inflorescências com e sem formigas (Tabela 5).

A proporção global de frutos formados por *P. corymbifera* foi apenas 3% maior ($z = 5,004$; $p < 0,001$) nas inflorescências com presença de formigas (10%; 477 frutos de 4807 flores) do que naquelas com formigas ausentes (7%; 299 frutos de 4281 flores). O pequeno aumento global da proporção de frutos formados na presença de formigas ocorreu devido a maioria dos indivíduos de *P. corymbifera* apresentar sucesso semelhante entre os tratamentos (Figura 12A). Em *P. nitidella*, a proporção global de frutos formados foi 8% maior ($z = 4,523$; $p < 0,001$) na presença de formigas (35%; 539 frutos de 1564 flores) do que na ausência delas (27%; 357 frutos de 1338 flores). Oposto ao encontrado em *P. corymbifera*, o aumento da proporção de frutos na presença de formigas ocorreu para a maioria dos indivíduos de *P. nitidella* (Figura 12B).

Efeito das formigas sobre a composição e a frequência de visitantes

O conjunto de espécies de visitantes florais, considerando a composição e a frequência relativa entre espécies, diferiu entre as inflorescências de *P. corymbifera* e inflorescências de *P. nitidella* ($p < 0,05$; ANOSIM). Entretanto, não houve diferença do conjunto de visitantes entre inflorescências com formigas e sem formigas para *P. corymbifera* ($p = 0,79$; ANOSIM) ou *P. nitidella* ($p = 0,88$; ANOSIM) (Figura 13A). O mesmo padrão - diferença entre inflorescências de *P. corymbifera* e *P. nitidella* e

ausência de diferença entre inflorescências com formigas e sem formigas da mesma espécie de planta - ocorreu também para análises tomando beija-flores e insetos visitantes separadamente (Figura 13B;13C).

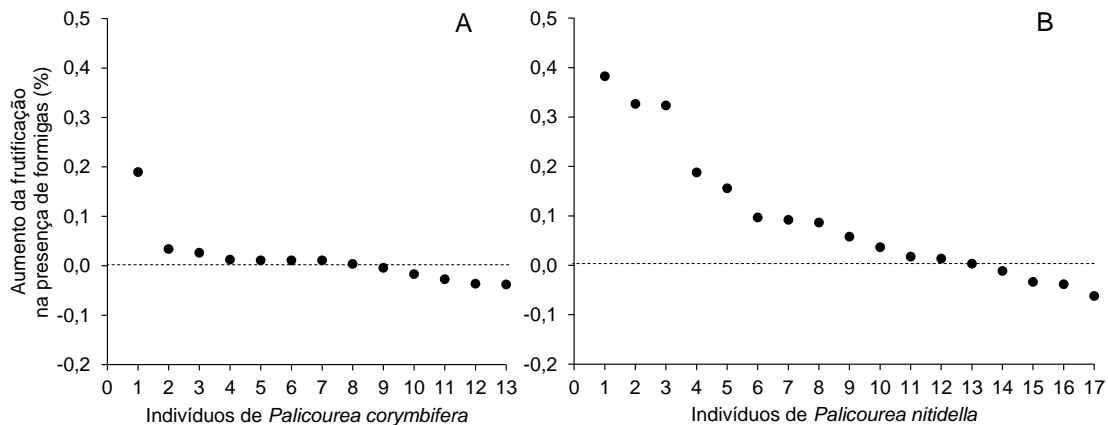


Figura 12. Aumento da frutificação na presença de formigas calculado pela diferença da proporção de frutos formados entre pares de inflorescências, com formigas e sem formigas, em 13 indivíduos de *Palicourea corymbifera* (A) e 17 indivíduos de *Palicourea nitidella* (B), em floresta de terra firme, Amazônia Central.

Adicionalmente, o total global de visitas recebidas por flor foi maior ($p < 0,05$; Mann-Whitney) em inflorescências de *P. nitidella* que em inflorescências de *P. corymbifera*, porém não houve diferença significativa entre inflorescências com e sem formigas da mesma espécie de planta ($p = 0,55$ para *P. nitidella* e $p = 0,62$ para *P. corymbifera*; Mann-Whitney) (Figura 14). A diferença encontrada entre as espécies de plantas quanto ao total de visitas por flor ocorreu principalmente devido à maior ($p < 0,05$; Mann-Whitney) frequência de insetos visitantes em *P. nitidella* do que em *P. corymbifera*; o total de visitas por flor realizadas por beija-flores não diferiu ($p = 0,28$; Kruskal-Wallis) entre inflorescências de *P. corymbifera* e *P. nitidella* (Figura 14).

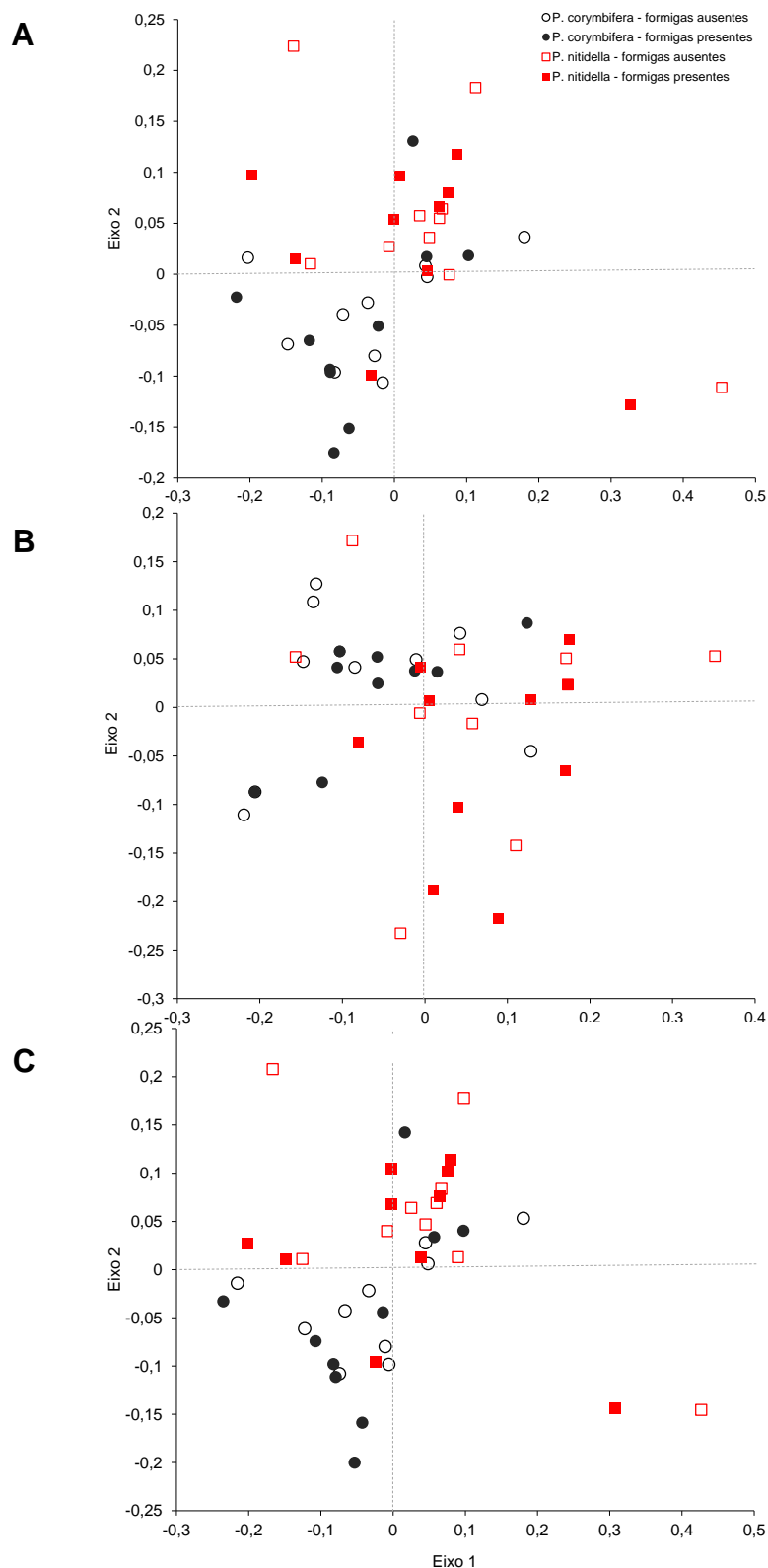


Figura 13. Similaridade (NMDS e índice de Bray-Curtis) da composição de espécies visitantes entre inflorescências focais de *Palicourea corymbifera* (símbolos pretos) e *Palicourea nitidella* (símbolos vermelhos) com formigas presentes (símbolos preenchidos) ou ausentes (símbolos vazados), em floresta de terra firme, Amazônia Central; (A) inclui todas as espécies de visitantes, (B) inclui apenas espécies de beija flores e (C) inclui apenas espécies de abelhas e borboletas.

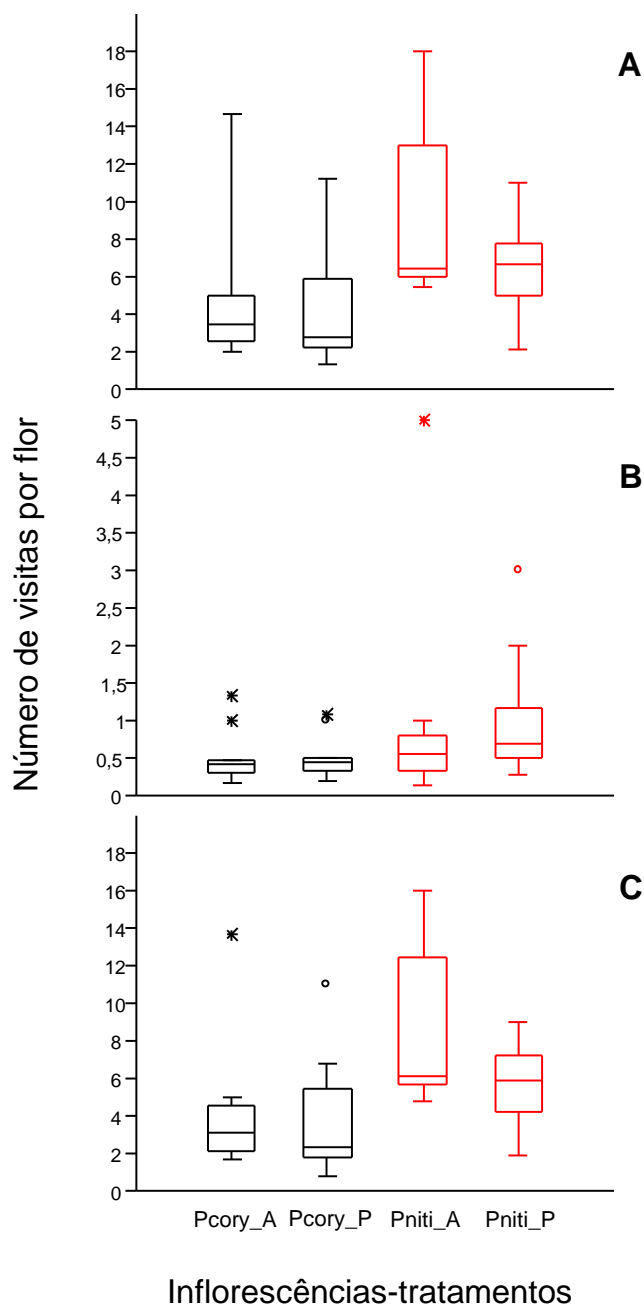


Figura 14. Mediana e quartis da variação do total de visitas por flor entre inflorescências focais de *Palicourea corymbifera* (Pcory) e *Palicourea nitidella* (Pniti) com formigas ausentes (Pcory_A e Pniti_A) ou presentes (Pcory_P e Pniti_P), em floresta de terra firme, Amazônia Central; (A) visitas de todas as espécies agrupadas, (B) visitas apenas de espécies de beija flores e (C) visitas apenas de espécies de abelhas e borboletas.

Tabela 05. Visitantes florais, número total de visitas, frequência relativa, duração das visitas e número de flores visitadas (média \pm DP) de *Palicourea corymbifera* e *Palicourea nitidella* (Rubiaceae) em floresta de terra firme na Amazônia Central.

n - nº de visitas; *s* - segundos.

Espécie	Visitantes florais	<u>Com formiga</u>				<u>Sem formiga</u>				
		Frequência <i>n</i> (%)		Duração da visita (s)		Frequência <i>n</i> (%)		Duração da visita (s)		Flores visitadas
<i>Palicourea corymbifera</i>	Apodiformes									
	<i>Phaethornis bourcierii</i> (Lesson, 1832)	14	3,9	7,1 \pm (3,5)	6,7 \pm (3,2)	14	3,6	8,8 \pm (4,5)	8,6 \pm (4,8)	
	<i>Phaethornis superciliosus</i> (Linnaeus, 1766)	2	0,6	7,3 \pm (3,1)	7,0 \pm (3,5)	3	0,8	6,5 \pm (2,1)	7,0 \pm (2,8)	
	<i>Thalurania furcata</i> (Gmelin, 1788) (fêmea)	25	6,9	7,1 \pm (3,9)	6,9 \pm (3,8)	26	6,8	8,0 \pm (3,7)	6,9 \pm (3,6)	
	<i>Thalurania furcata</i> (Gmelin, 1788) (macho)	13	3,6	8,7 \pm (5,4)	7,8 \pm (5,1)	6	1,6	5,7 \pm (3,5)	5,3 \pm (2,9)	
	Lepidoptera									
	<i>Heliconius numata</i> var <i>silvana</i> (Stoll, 1781)	20	5,5	15,4 \pm (11,2)	1,3 \pm (0,5)	25	6,5	32,4 \pm (19,8)	2,1 \pm (0,9)	
	Hymenoptera									
	<i>Euglossa decorata</i> (Smith, 1874)	2	0,6	20,0 \pm (14,1)	2,0 \pm (0,0)	2	0,5	22,5 \pm (17,7)	1,5 \pm (0,7)	
	<i>Leurotrigona pusilla</i> (Moure e Carmago, 1987)	56	15,5	15,8 \pm (8,3)	1,0 \pm (0,3)	52	13,5	25,5 \pm (13,0)	1,1 \pm (0,4)	
<i>Nogueirapis minor</i> (Moure e Carmago, 1982)	3	0,8	22,0 \pm (9,5)	1,0 \pm (0,0)	2	0,5	27,0 \pm (14,1)	1,0 \pm (0,0)		
<i>Trigona fulviventris</i> (Guérin, 1835)	214	59,3	32,6 \pm (33,8)	1,5 \pm (1,3)	231	60,2	47,5 \pm (41,4)	2,0 \pm (1,5)		
<i>Trigona williana</i> (Friese, 1900)	12	3,3	15,3 \pm (10,2)	1,2 \pm (0,4)	23	6,0	38,0 \pm (20,6)	2,0 \pm (1,2)		
<i>Palicourea nitidella</i>	Apodiformes									
	<i>Phaethornis bourcierii</i> (Lesson, 1832)	20	6,3	4,7 \pm (2,3)	4,5 \pm (2,2)	12	3,1	3,8 \pm (2,7)	3,5 \pm (2,6)	
	<i>Phaethornis ruber</i> (Linnaeus, 1758)	4	1,3	3,3 \pm (1,0)	3,0 \pm (1,4)	6	1,5	4,2 \pm (1,9)	4,2 \pm (1,9)	
	<i>Phaethornis superciliosus</i> (Linnaeus, 1766)	7	2,2	3,3 \pm (1,6)	3,1 \pm (1,8)	4	1,0	3,0 \pm (2,3)	3,0 \pm (2,3)	
	<i>Thalurania furcata</i> (Gmelin, 1788) (fêmea)	6	1,9	4,0 \pm (1,3)	4,0 \pm (1,3)	7	1,8	8,1 \pm (5,5)	6,4 \pm (4,0)	
<i>Thalurania furcata</i> (Gmelin, 1788) (macho)	2	0,6	7,0 \pm (2,8)	7,0 \pm (2,8)	2	0,5	4,5 \pm (2,1)	4,0 \pm (2,8)		

Continua

Tabela 05 (Continuação)

Espécie	Visitantes florais	<u>Com formiga</u>			<u>Sem formiga</u>		
		Frequência <i>n</i> (%)	Duração da visita (s)	Nº flores visitadas	Frequência <i>n</i> (%)	Duração da visita (s)	Flores visitadas
<i>Palicourea nitidella</i>	Lepidoptera						
	<i>Heliconius numata</i> var <i>silvana</i> (Stoll, 1781)	9 2,9	32,6 ± (24,6)	1,4 ± (0,5)	25 6,4	37,4 ± (27,7)	1,5 ± (0,7)
	<i>Hyalothyrus infernalis</i> (Möschler, 1877)	6 1,9	12,3 ± (10,1)	1,5 ± (0,5)	10 2,6	15,2 ± (8,7)	1,2 ± (0,4)
	Hymenoptera						
	<i>Leurotrigona pusilla</i> (Moure e Carmago, 1987)	42 13,3	18,5 ± (10,0)	1,0 ± (0,3)	56 14,3	23,0 ± (14,1)	1,1 ± (0,3)
	<i>Trigona fulviventris</i> (Guérin, 1835)	186 59,0	27,2 ± (18,1)	1,2 ± (0,6)	220 56,3	41,9 ± (31,4)	1,4 ± (1,0)
<i>Trigona williana</i> (Friese, 1900)	33 10,5	38,1 ± (41,2)	1,5 ± (1,1)	49 12,5	53,6 ± (43,3)	2,4 ± (1,8)	

Discussão

Palicourea corymbifera e *P. nitidella* apresentam floração anual, com duração de quatro e cinco meses, respectivamente, e padrão regular ao nível individual e populacional (Newstrom *et al.* 1994). A floração de *P. corymbifera* iniciou-se de forma assincrônica, e nos meses subsequentes apresentou um alto sincronismo, padrão semelhante foi observado na população de *P. nitidella*. Em alguns momentos as duas espécies apresentaram períodos de sobreposição na floração, contudo o pico de floração ocorreu em intervalos diferentes entre as espécies.

Essa diferenciação no período de pico entre as duas espécies pode ser positiva para ambas, pois de certa forma evita polinizações naturais interespecíficas, considerando que elas apresentaram sobreposição das mesmas espécies de polinizadores, contudo o sincronismo entre os indivíduos da mesma espécie é vantajoso. As estratégias fenológicas relativas à época e sincronia de floração, são consideradas importantes mecanismos envolvidos na otimização do processo reprodutivo (Stiles 1975; Palmer *et al.* 2003; Ávila Jr 2009).

O sincronismo de floração entre os indivíduos aumenta a possibilidade de sucesso reprodutivo devido à maior atração de polinizadores e deslocamentos desses vetores entre indivíduos diferentes da mesma espécie (Wikander 1984). Quando se trata de espécies distílicas, esse fato torna-se ainda mais grandioso, uma vez que favorece o fluxo de pólen entre as plantas, possibilitando a ocorrência de polinização legítima entre os morfotipos. O sincronismo e a floração em conjunto com os coespecíficos eleva a probabilidade de se reproduzir com sucesso, ainda mais quando se trata de espécies com sistemas sexuais polimórficos, dióicos ou em espécies autoincompatíveis (Rocca & Sazima 2006).

Palicourea corymbifera exibiu dois morfos florais e apresentou diferença significativa na altura do estigma e das anteras, porém à distância estigma-anteras foi menor em flores brevistilas que longistilas, não indicando a hercogamia reciprocamente perfeita. Segundo alguns estudos (Pailler & Thompson 1997; Faivre & McDade 2001) a hercogamia recíproca é fator chave para considerar uma espécie ou população verdadeiramente distílica. Para Barrett & Shore (1987), quanto mais intensa a hercogamia, maior é a ocorrência de cruzamentos intermórficos.

Contudo outras pesquisas vêm destacando que apesar da hercogamia ser um fator importante, outros aspectos devem ser levados em consideração, como por

exemplo, a presença dos dois morfos florais, pelo sistema de incompatibilidade e pela isopleia, como foi observado em populações de *Palicourea marcgravii* e *P. officinalis* que foram consideradas distílicas, mesmo não apresentando reciprocidade (Consolaro 2009). Três características que foram observadas em *P. corymbifera*, classificando-a como uma espécie verdadeiramente distílica, apesar da falta de hercogamia. Segundo Hamilton (1990), em muitas espécies heterostílicas o posicionamento recíproco entre os estiletos e estames pode ser exato, embora em muitos casos não seja perfeito.

Ao contrário de *P. corymbifera*, *P. nitidella* além dos morfos brevistilo e longistilo típicos, apresentou também as formas variantes ou semi-homostílicas, que diferentemente das distílicas típicas, apresentaram apenas uma pequena diferença na altura do estigma e das anteras, em alguns casos com anteras um pouco abaixo do estigma e em outros um pouco acima. A presença de morfos tipicamente distílicos e mais de um morfo variante não é comum, e ainda não foi relatado em espécies heterostílicas. Em geral espécies heterostílicas apresentam dois (distilia) ou três (tristilia) morfos (Barrett & Richards 1990; Barrett 1992; Kohn & Barrett 1992; Cunha & Fischer 2009; Cunha *et al.* 2014) ou podem ser ainda homostílicas.

A homostilia pode manifestar-se de três formas: homostilia longistila, estames na mesma altura do estigma na flor longistila; homostilia brevistila, estames no mesmo nível do estigma na flor brevistila; e homostilia intermediária, estames e estigma no nível intermediário entre os verticilos reprodutivos dos morfos longistilos e brevistilos (Hamilton 1990). Dentre as variações reportadas, os morfos variantes de *P. nitidella* parecem se encaixar na homostilia intermediária.

Teoricamente essas variações observadas em *P. nitidella*, podem indicar uma possível passagem do caráter distílico para o homostílico, visto que a hercogamia é sutil, bem diferente dos morfos tipicamente distílicos, cuja diferença é bem evidente, ou pode ser simplesmente uma variação na altura das estruturas reprodutivas, não indicando nenhuma modificação, em razão dos experimentos de polinização terem indicado autoincompatibilidade entre eles, e que no caso da homostilia a principal característica é autocompatibilidade (Hamilton 1990).

Palicourea ao qual essa espécie pertence, é tido como quase exclusivamente distílico (Taylor 1997), algumas espécies tem sido reportada como homostílicas. Consolaro *et al.* (2009) ao investigar o sistema distílico de quatro espécies de *Palicourea* distribuídas no Cerrado do Brasil Central, identificou que *Palicourea marcgravii* e *P. officinalis* apresentaram-se como espécies tipicamente distílicas,

contudo *P. coriacea* e *P. macrobotrys* apresentaram-se como variantes pela ocorrência de indivíduos com morfo homostilo, além da distilia na primeira espécie.

Apesar de casos da quebra da distilia serem reportados, não se sabe ao certo as forças evolutivas que determinam essas variações, contudo cada espécie pode responder de forma diferente, ou até mesmo não responder, perante as mesmas pressões seletivas a que estão submetidas (Charlesworth & Charlesworth 1979; Li & Johnston 2001; Consolaro *et al.* 2009).

Palicourea corymbifera e *P. nitidella* apresentaram alta viabilidade polínica, com porcentagens maiores que 85%, com uma modesta redução no número de grãos viáveis ao longo do dia entre os morfos. Apesar dessa pequena variação encontrada, os horários de maior viabilidade entre os morfos de cada espécie, ocorreram em intervalos diferentes.

A alta viabilidade polínica de certa forma pode favorecer a polinização efetiva, pois as chances de transporte de pólen viáveis pelos polinizadores entre os morfos serão maiores, levando conseqüentemente a fecundação, visto que para que haja efetivamente a fecundação do óvulo após a polinização, é preciso ter a garantia de que grãos viáveis estejam disponíveis aos polinizadores, caso contrário, as chances de cruzamentos serão menores (Chagas *et al.* 2010).

A alta viabilidade dos grãos de pólen, tal como verificado, é uma característica comum em espécies heterostílicas (Dulberger 1992), essa condição também foi registrada em outras espécies de Rubiaceae como em *Palicourea macrobotrys* (Coelho & Barbosa 2003), *Psychotria poeppigiana* (Coelho & Barbosa 2004), *Psychotria barbiflora* (Teixeira & Machado 2004) e *Psychotria carthagenensis* (Koch *et al.* 2010).

As porcentagens de açúcares do néctar obtidos para *P. corymbifera* foram próximas aos obtidos em outras espécies de Rubiaceae, como em *Palicourea marcgravii*, cuja concentração foi de $17,4 \pm 2,3$ para flores longistilas (L) e de $16,4 \pm 2,0\%$ para brevistilas (B), em *P. officinalis* (L - $14,7 \pm 5,50$ / B - $14,63 \pm 5,56\%$) e para *P. macrobotrys*, que é uma espécie homostílica ($17,90 \pm 2,18\%$) (Consolaro *et al.* 2009).

O néctar de *P. nitidella* se mostrou mais concentrado, se assemelhando aos valores obtidos em *Palicourea coriacea* (L - $25,60 \pm 2,50$ / B - $21,4 \pm 4,10$ / H - $27,00 \pm 2,60$) (Consolaro *et al.* 2009). Outros valores semelhantes foram encontrados em outras espécies de Rubiaceae (Passos & Sazima 1995; Consolaro 2005; Santos *et al.* 2008). As porcentagens de néctar em *P. corymbifera* e *P. nitidella* embora tenham sido baixas,

estão de acordo com o encontrado para espécies ornitófilas (Sazima *et al.* 1996; Buzato *et al.* 2000; Leal *et al.* 2006; Santos *et al.* 2008).

Apesar dos estudos de biologia floral avaliarem a porcentagem de açúcares do néctar, em sua maioria o fazem apenas do néctar acumulado, deixando de avaliar as variações ao longo do dia. Em *P. corymbifera* e *P. nitidella* foi observada uma pequena variação ao longo do dia na faixa de 1%.

Comparando as porcentagens entre flores longistilas e brevistilas, se observa a ocorrência de diferentes horários de pico entre eles, em *P. corymbifera* as 1200 h enquanto o morfo longistilo apresenta as maiores concentrações, há uma queda na concentração do morfo brevistilo, o inverso ocorre as 1500 h, agora com maior concentração do morfo brevistilo.

O semelhante foi observado em *P. nitidella*, com picos e quedas de concentração entre os morfos, em diferentes classes de horários do dia, contudo os morfos variantes parecem não acompanhar esse ritmo, na maior parte do tempo o morfo variante longistilo apresentou as maiores concentrações.

Essas flutuações do néctar e também do pólen, podem ter sido ao acaso, entretanto também podem ser uma estratégia da planta para favorecer o aumento das frequências de polinizações legítimas, os horários de pico para cada morfotipo seria como o “momento ótimo”, num dado momento, um morfo é mais atraente aos polinizadores, que então recebem mais carga de pólen de diferentes flores de um mesmo morfo, a seguir o outro morfo torna-se mais atrativo, e os beija-flores com pólen de várias flores do primeiro morfo visitam as flores do morfo recíproco.

Estudos nesse contexto são escassos, um dos poucos trabalhos existentes, indica que essa variação da concentração do néctar em diferentes horários do dia, deve-se ao curto tempo de vida da flor. Ao observarem a variação do volume e concentração do néctar em *P. macrobotrys*, constataram que no período da manhã a concentração era elevada, na faixa de $20,19 \pm 1,24\%$ reduzindo-se consideravelmente nos horários subsequentes, apresentando concentrações de $8,35 \pm 3,12\%$ (Coelho e Barbosa 2003) contudo não foi verificado a variação entre os diferentes morfos, pois trata-se de uma espécie homostílica.

Os testes experimentais de polinização indicaram que *Palicourea corymbifera* é autoincompatível, uma vez que apresentou incompatibilidade heteromórfica, só havendo a formação de frutos através dos cruzamentos legítimos (intermorfos). O sucesso na formação de frutos, nos cruzamentos intermorfos, foi semelhante em ambos os morfos

florais, e também entre polinização manual legítima e polinização natural. Em contrapartida na polinização natural a formação de frutos foi maior nas longistilas do que nas brevistilas.

A população de *Palicourea nitidella* também apresentou a condição de autoincompatibilidade, entre os morfotipos tipicamente distílicos e entre os variantes, entretanto, houve 1 a 2% de sucesso via geitonogamia nos morfos variantes. O sucesso na formação de frutos por polinização natural foi menor em plantas longistilas, que em plantas brevistilas, já nos morfos variantes o sucesso foi semelhante entre eles, contudo o morfo VL foi mais bem sucedido que VB.

Essa discreta variação na formação de frutos observada entre os morfos, pode estar relacionada com a taxa de deposição de pólen pelos visitantes. Embora mais internamente o estigma de flores brevistilas pode ter recebido mais carga de pólen legítimo e isso ter lhe favorecido o melhor sucesso, em contrapartida as flores VL, podem ter sido favorecidas por apresentarem o estigma acima das anteras, mas internamente a corola, diferente da longistila típica, que muitas vezes apresenta o estigma além do tubo floral ou bem próximo da abertura, e acaba recebendo toda sorte de pólen, que foi desvantajosa para as flores longistila de *P. nitidella*, mas que foram vantajosas para as de *P. corymbifera*.

Variações no comportamento reprodutivo entre espécies cogenéricas são frequentemente encontradas (Washitani *et al.* 1994; Castro & Araújo 2004), podendo, muitas vezes, manifestar-se na própria frutificação. Sucessos distintos entre morfos de espécies distílicas têm sido registrados, e as justificativas para essas diferenças envolveram o comportamento de polinizadores (Stone 1996; Teixeira & Machado 2004; Castro & Araújo 2004; Consolaro *et al.* 2009) e a oclusão do estigma de flores longistilas com pólen incompatível (Teixeira & Machado 2004).

Comparando os resultados de polinização natural e polinização manual legítima entre os diferentes morfos, nas duas espécies de *Palicourea*, constata-se que a formação de frutos em condições naturais não diferiu do sucesso via polinizações legítimas manuais, indicando portanto, que as duas espécies de *Palicourea* não sofreram limitação de polinizadores na área de estudo. Quando existe limitação à taxa de frutificação tende a ser maior nos tratamentos de polinização cruzada manual, do que na natural (Ruiz e Arroyo 1978; Zapata & Arroyo 1978; Bullock 1985).

As flores de *P. corymbifera* e *P. nitidella* apresentam características típicas da síndrome ornitofilia (Faegri & Van der Pijl 1979), tais como antese diurna, corola

tubular relativamente rígida, coloração conspícua, produção de néctar distante das estruturas reprodutivas e ausência de odor. Apesar das características ornitófilas, as flores de *P. corymbifera* e *P. nitidella* também foram visitadas por abelhas e borboletas.

Com base na frequência de visitas e comportamento, as espécies de beija-flores podem ser consideradas as mais importantes para a polinização de *P. corymbifera* e *P. nitidella*, como também reportado para outras espécies de Rubiaceae (Bawa & Beach 1983; Passos & Sazima 1995; Silva 1995; Castro & Oliveira 2001; Coelho & Barbosa 2003; Consolaro *et al.* 2005). As borboletas podem ser consideradas como polinizadores ocasionais, pois tocavam os órgãos reprodutivos da flor e grãos de pólen ficam aderidos à probóscide, mas foram pouco frequentes e visitaram apenas alguns indivíduos.

Por outro lado, as abelhas *Trigona fulviventris* e *T. williana* foram muito frequentes, mas apenas ocasionalmente contatavam os estigmas e, muitas vezes, danificavam a base da flor para pilhar néctar. *Leurotrigona pusilla* é uma abelha pequena que ocasionalmente pode atuar como polinizadora, uma vez que grãos de pólen ficam depositados em seu corpo. Considerando os morfos variantes de *P. nitidella*, cuja altura das estruturas reprodutivas são próximas, as possibilidades de ocorrência de polinização tornam-se maiores, não apenas para *Leurotrigona pusilla*, mas também para as demais espécies de abelhas.

Palicourea corymbifera e *P. nitidella* interagiram no total com 19 espécies de formigas que visitaram preferencialmente os nectários pericárpicos de suas inflorescências. A partir dos experimentos de exclusão de formigas foi observado maior sucesso na formação de frutos em inflorescências com formigas, do que nas sem formigas, havendo, portanto uma tendência de maior produção nas inflorescências com formigas.

Em *Tocoyena formosa* (Rubiaceae) no Cerrado, as formigas também parecem não influenciar a reprodução da planta, pois não houve diferenças significativas entre a formação de frutos nos grupos de plantas com e sem formigas, contudo foi constatada uma variação na média a favor de plantas com formiga (Santos & Del-Claro 2001). Outros estudos, entretanto, indicam que a produtividade é maior em plantas com presença de formigas (Costa *et al.* 1992; Del-Claro *et al.* 1996; Oliveira 1997).

Embora a maior produção de frutos em inflorescências com formigas, não houve efeito de formigas sobre a composição de espécies de visitantes e nem sobre o total de visitas por flor em *P. corymbifera* e *P. nitidella*, diferente do que foi observado em *Passiflora coccinea* (Passifloraceae) onde as formigas impediram que borboletas

pousassem nas flores para pilhar o néctar (Leal *et al.* 2006). De modo oposto, Filho & Leal (2012) encontraram efeito negativo da presença de formigas sobre os visitantes florais de *Calotropis procera* (Apocynaceae) e, potencialmente, negativo sobre a polinização por dificultarem o acesso dos polinizadores às flores.

O conjunto de espécies de visitantes florais observados nas duas espécies de *Palicourea* foi semelhante entre as inflorescências com à presença ou ausência de formigas, embora tenha apresentado uma pequena diferença entre as duas espécies de plantas, pois algumas morfoespécies de visitantes eram mais comuns em uma espécie de planta que na outra, como por exemplo o beija-flor *Phaethornis ruber* que só foi observado visitando flores de *P. nitidella*. O número de visitas foi semelhante entre inflorescências com e sem formigas, nas duas espécies de planta, porém vale ressaltar que *P. nitidella* recebeu mais visitas de insetos por flor do que *P. corymbifera*.

Considerando que as formigas não influenciaram nas visitas, visto que o conjunto de visitantes foi semelhante entre inflorescências com e sem formigas, contudo, houve maior formação de frutos em inflorescências com formigas. Os resultados sugerem então que as formigas visitantes dos nectários pericápicos de *P. corymbifera* e *P. nitidella* podem conferir proteção contra danos de herbívoros, a presença de formigas pode atuar para proteger as flores ou frutos imaturos, impedindo que esses tecidos sejam danificados e acabam favorecendo o sucesso de frutificação.

Segundo Oliveira (1997), quanto mais próximas às formigas estão dos NEFs, maior é a proteção. Em *T. formosa* as formigas excluíram mais herbívoros na região das inflorescências do que nas folhas e como consequência, as plantas com formigas apresentaram melhor desempenho no peso de frutos e na relação frutos/botões e menor número de herbívoros (Santos & Del-Claro 2001).

Outro aspecto importante é o fato de *P. nitidella* receber uma quantidade maior de visitas por flor de insetos, comparada à *P. corymbifera*, o que poderia inclusive nos dar uma ideia sobre a ocorrência dos morfos variantes (VB e VL). A visitação por beija-flores tende a ser mais efetiva para promover a polinização legítima (cruzada entre morfos), pois durante as visitas sempre devem contatar anteras e estigmas de ambos os morfos. Por outro lado, as abelhas coletoras de pólen podem não entrar em contato com estigmas dos morfos distílicos típicos, pois eles ficam mais distantes das anteras, ao passo que nos morfos variantes, a distância entre anteras e estigmas é muito reduzida e aumenta as chances de polinização por essas abelhas.

Em *Palicourea coriacea*, uma espécie que apresenta flores brevistilas, longistilas e homostílicas, teve como principal polinizador uma abelha. Uma condição rara para o gênero, pois as flores apresentam características para ornitofilia (Consolaro 2009). Em *P. padifolia*, as abelhas também foram os principais visitantes, entretanto a sua eficiência no fluxo de pólen intermorfo foi questionada e discutido seu papel na quebra da distília dessa espécie (Ree 1997).

Para algumas espécies, o papel dos polinizadores no fluxo de pólen intermorfo não parece ser tão importante, contudo diante desse quadro, pode-se pensar que essa variação pode ter sido ocasionado pelo conjunto de visitantes, nesse caso os insetos, também foi sugerido para *Palicourea coriacea* e *P. padifolia*. E o fato do morfo longistilo de *P. nitidella* ter menor sucesso em polinização natural e apresentar hercogamia mais conspícua, torna isso uma evidencia ainda maior.

Conclusões

Palicourea corymbifera e *P. nitidella* apresentaram floração anual, com alto sincronismo nos períodos de pico de floração, com períodos de sobreposição na floração, mas com intervalos diferentes no pico de floração entre as duas espécies.

As duas espécies são distílicas, contudo *P. nitidella*, além dos morfos tipicamente distílicos apresentou morfos variantes, indicando uma possível passagem da condição heterostílica para a homostílica.

Ambas espécies de *Palicourea* são autoincompatíveis, e o sucesso de formação de frutos entre os tratamento de polinização cruzada legítima e natural não diferiram, indicando que elas não estão sofrendo limitação de polinizadores no local de estudo.

Os principais visitantes foram os beija-flores *Thalurania furcata*, *Phaethornis bourcieri*, *Ph. superciliosus* e *Ph. ruber* que visitou somente *P. nitidella*, a borboleta *Heliconius numata* e as abelhas *Trigona fulviventris* e *Leurotrigona pusilla*.

Os beija-flores foram considerados os polinizadores principais, pois realizaram visitas legítimas e os demais foram considerados polinizadores ocasionais.

Dezenove espécies de formigas interagiram com as duas espécies de *Palicourea*, sendo *Crematogaster tenuicula*, *C. brasiliensis* e *Ectatomma tuberculatum* as mais frequentes, e *Solenopsis loretana* as mais abundantes.

Houve uma tendência de maior produção de frutos em inflorescências com formigas, que nas inflorescências sem formigas.

O conjunto de espécies de visitantes florais não diferiu significativamente devido à presença ou ausência de formigas, em ambas espécies, embora tenha sido significativamente diferente entre as duas espécies de planta.

O número de visitas por flor não diferiu entre inflorescências com e sem formigas, nas duas espécies de planta, assim como o número de visitas por flor pelos beija-flores (separadamente) também não diferiu entre as plantas, porém *P. nitidella* recebeu mais visitas de insetos por flor do que *P. corymbifera*.

As formigas não influenciaram nas visitas, contudo, houve maior formação de frutos em inflorescências com formigas, sugerindo que as formigas podem conferir proteção contra danos de herbívoros, e com isso favorecendo o sucesso de frutificação.

Palicourea nitidella recebeu uma quantidade maior de visitas de insetos por flor, comparada à *P. corymbifera*, diferença que pode ter favorecido a ocorrência dos morfos variantes (VB e VL) na primeira espécie.

Bibliografia citada

- Agrawal, A. A., Rutter, M. T. 1998. Dynamic anti-herbivore defense in ant-plants: the role of induced responses. *Oikos*, 83:227-236.
- Andersson, L. 1992. A provisional checklist of Neotropical Rubiaceae. *Scripta Botanica Belgica*, 1:1–199.
- Avila Jr., R.S. 2009. A guilda de plantas esfingófilas e a comunidade de Sphingidae em uma área de Floresta Atlânticas do Sudeste do Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Ávila Jr, R. S.; Freitas, L. 2011. Frequency of visits and efficiency of pollination by diurnal and nocturnal lepidopterans for the dioecious tree *Randia itatiaiae* (Rubiaceae). *Australian Journal of Botany*, 59: 176–184.
- Bahadur, B. 1968. Heterostyly in Rubiaceae: a review. *Journal of Osmania University (Science). Golden Jubilee Volume*, 207–238.
- Baker, H. G. 1966. The evolution, functioning and breakdown of heteromorphic incompatibility systems. I. The Plumbaginaceae. *Evolution*, 20: 349-68.
- Barbosa, A. A. A. 1997. *Biologia reprodutiva de uma comunidade de Campo Sujo, Uberlandia, MG*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Barrett, S. C. H. 1977. Tristyly in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. (water hyacinth). *Biotropica*, 9: 230-238.
- Barrett, S. C. H.; Shore, J. S. 1987. Variation and evolution of breeding systems in *Turnera ulmifolia* L. complex (Turneraceae). *Evolution*, 41: 340-354.
- Barrett, S. C. H. 1988. The evolution, maintenance, and loss of self-incompatibility systems. In *Plant reproductive ecology: patterns and strategies* (L. Lovett Doust, ed.). University Press, New York. p.98-124.
- Barrett, S. C. H., Richards, J. H., 1990. Heterostyly in tropical plants. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 55: 35-61.
- Barrett, S. C. H. 1992. Evolution and function of heterostyly. Springer-Verlag, New York.
- Barrett, S. C. H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: Barrett, S. C. H. (ed.). *Evolution and function of heterostyly*. pp. 1-24. Monographs on Theoretical and Applied Genetics, 279p.
- 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.

- Bawa, K. S.; Bullock, S. H.; Perry, D. R.; Coville, R. E.; Grayum, M. H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination systems. *American Journal of Botany*, 72, 346-356.
- Bawa, K. S.; Ashton, P. S.; Primack, R. B.; Terborgh, J., Mohd Nor, S., NG, F.S. P.; Hadley, M. 1989. Reproductive ecology of tropical forest plants. Research insights and management implications [Special Issue]. *Biology International*, 21:1-56.
- Beach, J. H.; Bawa, K. S. 1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distily. *Evolution* 34: 1138-1142.
- Bencke, C. S. C.; Morellato, P. C. 2002. Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Revista Brasileira de Botânica*, 25: 269-275.
- Bentley, B. L. 1977. Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 8: 407-427.
- Bullock, S. H. 1985. Breeding systems of trees in the flora of a tropical deciduous forest. *Biotropica*, 17: 287-301.
- Buzato, S.; Sazima, M.; Sazima, I. 2000. Hummingbird pollinated floras at three Atlantic forest sites. *Biotropica*, 32: 824-841.
- Campos, M. T. V.; Brito, J. M. 1999. Rubiaceae. In J. E. L. S. Ribeiro; M. J. G. Hopkins; A. Vincentini; C. A. Sothers; M. A. S. Costa; J. M. Brito; M. A. D. Souza; L. H. P. Martins; L. G. Lohmann; P. A. C. L. Assunção; E. C. Pereira; C. F. Silva; M. R. Mesquita & L. C. Procópio. *Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. INPA. 798 p.
- Canela, M. B. F., Sazima, M. 2003. Florivory by the crab *Armases angustipes* (Grapsidae) influences hummingbird visits to *Aechmea pectinata* (Bromeliaceae). *Biotropica*, 35: 289-294.
- Castro, C. C.; Oliveira, P. E. A. M. 2001. Reproductive biology of the protandrous *Ferdinandusa speciosa* Pohl (Rubiaceae) in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, 24:167-172.
- Castro, C. C.; Araújo, A. C. 2004. Distyly and sequential pollinators of *Psychotria nuda* (Rubiaceae) in the Atlantic rain forest, Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, 244: 131-139.
- Castro, C. C.; Oliveira, P. E.; Alves, M. C. 2004. Breeding system and floral morphology of distylous *Psychotria* L. species in the Atlantic Rain Forest, SE Brazil. *Plant Biology*, 6:755-760.
- Chagas, E. A.; Pio, R.; Chagas, P. C.; Pasqual, M; Bettil Neto, J. E . 2010. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. *Ciência rural Santa Maria*, 40 (2), 261-266.

- Charlesworth, D.; Charlesworth, B. 1979. A model for evolution of heterostyly. *American Naturalist*, 114:467-498.
- Coelho, C. P.; Barbosa, A. A. 2003. Biologia reprodutiva de *Palicourea macrobotrys* Ruiz & Pavon (Rubiaceae): um possível caso de homostilia no gênero *Palicourea* Aubl. *Revista Brasileira de Botânica*, 26 (3): 403-413.
- Coelho C. P.; Barbosa, A. A. A. 2004. Biologia reprodutiva de *Psychotria poeppigiana* Mült. Arg. (Rubiaceae) em mata de galeria. *Acta Botânica Brasilica*, 18:481-489.
- Consolaro, H.; Silva, E. B.; Oliveira, P. E. 2005. Variação floral e biologia reprodutiva de *Manettia cordifolia* Mart. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 28: 85-94.
- Consolaro, H.; Toledo, R. D. P.; Ferreguti, R. L.; Hay, J.; Oliveira, P. E. 2009. Distilia e homostilia em espécies de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) do Cerrado do Brasil Central. *Revista Brasileira de Botânica*, 32 (4): 677-689.
- Consolaro, H.; Silva, S. C. S.; Oliveira, P. E. 2011. Breakdown of distyly and pinmonomorphism in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Plant Species Biology*, 26: 24-32.
- Costa, F. M. C. B.; Oliveira-Filho, A.T.; Oliveira, P. S. 1992. The role of extrafloral nectarines. in *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) in limiting herbivory: an experiment of ant protection in Cerrado vegetation. *Ecological Entomology*, 17: 363 - 365.
- Costa, F. R.; Espinelli, F. P.; Figueiredo, F. O. G. 2008. *Guia de marantáceas da Reserva Ducke e da Reserva Biológica do Uatumã, Manaus*: Áttema Design Editorial, 162 p.
- Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N.G. 2000. Natural products (Secondary Metabolites). In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (B. Buchanan, W. Gruissem & R. Jones, eds.). *American Society of Plant Physiologists*, Rockville, p.1250-1318.
- Cunha, N. L.; Fischer, E. 2009. Breeding system of tristylous *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) in the southern Pantanal, Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, 280: 53-58.
- Cunha, N. L.; Fischer, E.; Lorenz-Lemke, A. P.; Barrett, S. C. H. 2014. Floral variation and environmental heterogeneity in a tristylous clonal aquatic of the Pantanal wetlands of Brazil. *Annals of Botany* (doi:10.1093/aob/mcu181, available online at www.aob.oxfordjournals.org).
- Cunningham, S. A. 1995. Ecological constraints on fruit initiation by *Calypstrogyne ghiesbreghtiana* (Arecaceae): floral herbivory, pollen availability, and visitation by pollinating bats. *American Journal of Botany*, 82: 1527-1536.
- Dafni, A. 1992. *Pollination ecology: a practical approach*. New York, Oxford University Press., 250pp.

- Del-Claro, K.; Berto, V.; Réu, W. 1996. Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). *Journal of Tropical Ecology*, 12:887-892.
- Del-Claro, K. 2004. Multitrophic relationships, conditional mutualisms, and the study of interaction biodiversity in tropical savannas. *Neotropical Entomology*, 33:665-672.
- Del-Claro, K.; Guillermo-Ferreira, R.; Almeida, E. M.; Zardini, H.; Torezan-Silingardi, H. M. 2013. Ants Visiting the Post-Floral Secretions of Pericarpial Nectaries in *Palicourea rigida* (Rubiaceae) Provide Protection Against Leaf Herbivores But Not Against Seed Parasites. *Sociobiology*, 60(3): 217-221.
- Dulberger, R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In: Barrett S. C. H. (ed.). *Evolution and Function of Heterostyly*. Springer, Berlin, pp. 41–84.
- Endress, P. K. 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 407p.
- Faegri, K.; Pijl, V. D. 1979. *The principles of pollination ecology*. Oxford, UK: Pergamon Press, 127p.
- Faivre, A. M.; 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.; Araújo, A. C. 2012. Flexible mating system in distylous populations of *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae) in Brazilian Cerrado. *Plant Systematics and Evolution*, 298:619-627.
- Feinsinger, P. 1983. Coevolution and pollination. In *Coevolution* (D.J. Futuyma & M. Slatkin). Sinauer Associates, Sunderland. p.282-310.
- Ferreira, M. H. S. 2009. Polinização e mirmecofilia em *Pityrocarpa moniliformis* (Benth.) Luckow & Jobson (Leguminosae: Mimosoideae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia. 160 p.
- Fischer, E.; Leal, I. R. 2006. Effect of nectar secretion rate on pollination success of *Passiflora coccinea* (Passifloraceae) in the central Amazon. *Brazilian Journal of Biology*, 66:29-41.
- Ganders, F. R. 1975. Fecundity in distylous and self-incompatible homostylous plants of *Mitchella repens* (Rubiaceae). *Evolution* 29: 186–188.
- Ganders, F. R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany*, 17: 607-635.
- Gullan, P. J.; Cranston, P.S. 1994. The Insects. *An outline of Entomology*. Chapman & Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, pp. 450.

- 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.
- Hammer, O.; Harper, D. A. T.; Ryan, P. D. 2001. Past: Paleontological statistics software Packaged for education and data analysis. Version 1.94b. *Palaentologia Electronica*, 4 (1), 1-9.
- Hölldobler, B.; Wilson, E. O. 1990. *The Ants*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 732p.
- Horvitz, C. C; Schemske D. W. 1984. Effects of ants and attended herbivore on seed production of a neotropical herb. *Ecology*, 65:1369–1378.
- Leal, C. F.; Lopes, V. A.; Machado, C. I. 2006. Polinização por beija-flores em uma área de caatinga no Município de Floresta, Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 29: 379-389.
- Li, P.; Johnston, M. O. 2001. Comparative floral morphometrics of distyly and homostyly in three evolutionary lineages of *Amsinckia* (Boraginaceae). *Canadian Journal of Botany*, 79:1332-1348.
- Janzen, D. H. 1969. Seed predation by animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 2:465-492.
- Johnson, S. G.; Delph, L. F.; Elderkin, C. L. 1995. The effect of petal-size manipulation on pollen removal, seed-set, and insect-visitor behavior in *Campanula americana*. *Oecologia*, 102:174-179.
- Judy L. Stone 1996. Components of pollination effectiveness in *Psychotria suerrensis*, a tropical distylous shrub. *Oecologia*, 107: 504-512.
- Karban, R.; Strauss, S. Y. 1993. Effects of herbivores on growth and reproduction of their perennial host, *Erigeron glaucus*. *Ecology*, 71: 39-46.
- Kéry, M.; Matthies, D.; Spillmann, H. H. 2000. Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primula veris* and *Gentiana lutea*. *Journal of Ecology*, 88: 17-30.
- Koch, A. K.; Silva, P. C.; Silva, C. A. 2010. Biologia reprodutiva de *Psychotria carthagenensis* (Rubiaceae), espécie distílica de fragmento florestal de mata ciliar, Centro-Oeste do Brasil. *Rodriguésia*, 61:551-558.
- Kohn, J. R.; Barret, S. C. H. 1992. Experimental studies on the functional significance of heterostyly. *Evolution*, 46: 43-55.
- Leal, I. R.; Fischer, E.; Kost, C.; Tabarelli, M.; Wirth, R. 2006. Ant protection against herbivores and nectar thieves in *Passiflora coccinea* flowers. *Écoscience*. 13 (4): 431-438.

Lohman, D. J.; Zangerl, A. R.; Berenbaum, M. R. 1996. Impact of floral herbivory by parsnip webworm (Oecophoridae: *Depressaria pastinacella* Duponchel) on pollination and fitness of wild parsnip (Apiaceae: *Pastinaca sativa* L.). *American Midland Naturalist*, 136: 407-412.

Lloyd, D. G.; Webb, C. J. 1992. The evolution of heterostyly. In: Barret, S. C. H. (ed.). *Evolution and function of heterostyly*. Monographs on theoretical and applied genetics. 279 p.

Marques-Filho, A. O.; Ribeiro, M. N. G.; Santos, H. M.; Santos, J. M. 1981. Estudos climatológicos da Reserva Florestal Ducke - Manaus, AM. *Acta Amazonica*, 11: 759-786.

Marquis, R. J.; Braker, H. E. 1994. Plant-herbivore interactions: diversity, specificity, and impact. In *La Selva: Ecology and Natural History of a Neotropical Rain Forest* (L. A. McDade, K. S. Bawa, H. A. Hespeneide & G. S. Hartshorn, eds.). Chicago Press, Chicago, p. 261-281.

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.

Mothershead, K.; Marquis, R. B. 2000. Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant-pollinator interactions in *Oenothera macrocarpa*. *Ecology*, 81:30-40.

Mutikainen, P.; Delph, L. F. 1996. Effects of herbivory on male reproductive success in plants. *Oikos*, 75: 353-358.

Nascimento, E. A.; Del-Claro, K. 2010. Ant visitation to extrafloral nectaries decreases herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a Neotropical Savanna. *Flora*, 205: 754-756.

Newstrom, L. E.; Frankie, G. W.; Baker, H. G. 1994. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica*, v. 26, n. 2, p.141-159.

O'dowd, D. J.; Catchpole, E. A. 1983. Ants and extrafloral nectaries: no evidence for plant protection in *Helichrysum* spp. - ant interactions. *Oecologia*, 59: 191 - 200.

Oliveira, P. S. 1997. The ecological function of extrafloral nectaries: herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Functional Ecology*, 11: 323 – 330.

Oliveira, P. S.; Rico-Gray, V.; Díaz-Castelazo, C.; Castillo-Guevara, C. 1999. Interaction between ants, extrafloral nectaries and insect herbivores in Neotropical coastal sand dune: herbivore deterrence by visiting ants increases fruit set in *Opuntia stricta* (Cactaceae). *Functional Ecology*, 13: 623-631.

Oliveira, P. S.; Freitas, A. V. L.; Del-Claro K. 2002. Ant foraging on plant foliage: contrasting effects on the behavioral ecology of insect herbivores. In *The Cerrados of*

- Brazil: ecology and natural history of a Neotropical savanna* (P.S. Oliveira & R.J. Marquis, orgs.). Columbia University Press, New York. p. 287-305.
- Oliveira, M. L.; Baccaro, F. B.; Braga, R. N.; Magnusson, W. E. 2008. *Reserva Ducke: a biodiversidade amazônica através de uma grade*. Manaus: Áttema Design Editorial, 170 p.
- Palmer, T.; Stanton, M. L.; Young, T. P. 2003. Competition and coexistence: exploring mechanisms that restrict and maintain the diversity within mutualistic guilds. *American Naturalist* 162 (supplement), 63-79.
- 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). *Botanica Acta*, 108:309-313.
- Prance, G. T. 1990. The floristic composition of the forests of Central Amazonian Brazil. In: A. H. Gentry (ed.), *Four Neotropical rainforests*. Yale University Press, New Haven and London.
- Proctor, M.; Yeo, P.; Lack, A. 1996. *The Nature History of pollination*. Timber Press, Portland, Oregon, 480 p.
- Quesada, M.; Bollman, K.; Stephenson, A. G. 1995. Leaf damage decreases pollen production and hinders pollen performance in *Cucurbita texana*. *Ecology*, 76:437-443.
- Radford, A. E.; Dicikson, W. C.; Massey, J. R.; Bell, C. R. 1974. *Vascular plant systematics*. New York: Harper & Row, 891p.
- Rashbrook, V. K.; Compton, S. G., Lawton, J. H. 1992. Ant herbivore interactions: reasons for the absence of benefits to a fern with foliar nectaries. *Ecology*, 73(6): 2167 - 2174.
- Razafimandimbison, S. G; Moog, J.; Lantz, H.; Maschwitz, U.; Bremera, B. 2005. Re-assessment of monophyly, evolution of myrmecophytism, and rapid radiation in *Neonauclea* s.s. (Rubiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34: 334–354.
- Ree, R. H. 1997. Pollen flow, fecundity and the adaptive significance of heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Biotropica* 29:298-308.
- Riba-Hernandez, P.; Stoner, K. E. 2005. Massive destruction of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae) flowers by Central America spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). *Biotropica*, 37:274-278.
- Ribeiro, M. N. G. 1976. Aspectos climatológicos de Manaus. *Acta Amazonica*, 6 (2): 229-233.

- Ribeiro, J. E. L. S.; Hopkins M. J. C.; Vicentini, A.; Sothers, C. A.; Costa, M. A. S.; Brito, J. M.; Souza, M. A. D.; Martins, L. H. P.; Lohman, L. G.; Assunção, P. A. C. L.; Pereira, E. C.; Silva, C. F.; Mesquita, M. R.; Procópio, L. P. 1999. *Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. INPA-DFID, Manaus. 816 pp.
- Richards, A. J. 1986. *Plant breeding systems*. George Allen & Unwin, London, 529 p.
- Richards, J. H.; Koptur, S. 1993. Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae) *American Journal of Botany* 80: 31-40.
- Rico-Gray, V.; Oliveira, P. S. 2007. *The ecology and evolution of ant-plant interactions*. Chicago: The University of Chicago Press.
- Robbrechet, E. 1988. Tropical woody Rubiaceae. *Opera Botanica Belgica*, 1: 1-272.
- Rocca, M. A.; Sazima, M. 2006. The dioecious, sphingophilous species *Citharexylum myrianthum* (Verbenaceae): pollination and visitor diversity. *Flora*, 201, 440-450.
- Ruiz, T. Z.; Arroyo, M.T.K. 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest. *Biotropica*, 10: 221-230.
- Rodrigues, E. B. 2013. *Ecologia reprodutiva de espécies de Psychotria L. (Rubiaceae) em fragmentos de floresta estacional semidecidual*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 72p.
- 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.
- Sakai, S.; Wright, S. J. 2008. Reproductive ecology of 21 coexisting *Psychotria* species (Rubiaceae): when is heterostyly lost? *Biological Journal of the Linnean Society*, 93:125-134.
- Santos, J. C.; Del-Claro, K. 2001. Interação entre formigas, herbívoros e nectários extraflorais em *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlechtd.) K. Schum. (Rubiaceae) na vegetação do cerrado. *Revista Brasileira de Zoociências*, 3: 77-92.
- 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(1): 275-285.
- Sazima, M.; Buzato, S.; Sazima, I. 1996. An assemblage of hummingbird-pollinated flowers in a montane forest in southeastern Brazil. *Botanica Acta*, 109: 149-160.
- Sobrevila, C.; Ramirez N.; Enrech, N. X. 1983. Reproductive biology of *Palicourea fendleri* and *P. petiolares* (Rubiaceae), heterostylous shrubs of a tropical cloud forest in Venezuela. *Biotropica*, 15: 161–169.

- Schwade, M. R. M.. 2010. *Biologia reprodutiva de três espécies de Retiniphyllum Bonpl. (Rubiaceae) em vegetação de Campinarana na Amazônia Central. Manaus*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 69 p.
- Silva, A. P. 1995. *Biologia Reprodutiva e Polinização de Palicourea rigida H.B.K. (Rubiaceae)*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, 82p.
- Stiles, F. G. 1975. Ecology, flowering phenology and hummingbird pollination of some Costa Rican *Heliconia* species. *Ecology*, 56: 285-301.
- Stone, J. L. 1996. Components of pollination effectiveness in *Psychotria suerrensis*, a tropical distylous shrub. *Oecologia*, 107 (4), 505-512.
- Suzuki, N.; Ogura, K.; Katayama, N. 2004. Efficiency of herbivore exclusion by ants attracted to aphids on the vetch *Vicia angustifolia* L. (Leguminosae). *Ecological Review*, 19: 275-282.
- Strauss, S.Y.; Conner, J.K.; Rush, S. 1996. Foliar herbivory affects floral characters and plant attractiveness to pollinators: implications for male and female plant fitness. *American Naturalist*, 147:1098-1107.
- Tanner, E. 1982. Breeding systems in a tropical forest in Jamaica. *Biological Journal of the Linnean Society* 18:263-278.
- Taylor, C. M. 1997. Conspectus of the genus *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotriace) with the description of some new species from Ecuador and Colombia. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 84:224-262.
- Taylor, C. M.; Campos, M. T. V. A.; Zappi, D. 2007. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. *Rodriguésia*, 58 (3): 549-616.
- Teixeira, L. A. G. 2001. *Biologia da polinização de duas espécies simpátricas de Rubiaceae em um remanescente de Mata Atlântica de Pernambuco*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 79 p.
- Teixeira, L. A. G.; Machado, I. C. 2004a. Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 18: 853-886.
- Teixeira, L. A. G.; Machado, I.C. 2004b. *Sabicea cinerea* Aubl. (Rubiaceae): distília e polinização em um fragmento de floresta Atlântica em Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 27:193-204.
- Valois-Cuesta, H.; Soriano, P. J.; Ornelas, J. F. 2011. Asymmetrical legitimate pollination in distylous *Palicourea demissa* (Rubiaceae): the role of nectar production and pollinator visitation. *Journal of Tropical Ecology*, 27:393-404.
- Valois-Cuesta, H.; Soriano, P. J.; Ornelas, J. F. 2012. Gender specialization in *Palicourea demissa* (Rubiaceae), a distylous, hummingbird - pollinated treelet. *Plant Systematics and Evolution*, 298: 975-984.

Vesprini, J. L.; Galetto, L.; Bernardello, G. 2003. The beneficial effect of ants on the reproductive success of *Dyckia floribunda* (Bromeliaceae), an extrafloral nectary plant. *Canadian Journal of Botany*, 81:24-27.

Washitani I.; Osawa R.; Namai H.; Niwa M. 1994. Patterns of female fertility in heterostylous *Primula sieboldii* under severe Pollinator limitation. *Journal of Ecology*, 82: 571–579.

Wikander, T. 1984. Mecanismos de dispersión de diasporas de una selva decidua en Venezuela. *Biotropica*, n. 16, p. 276-283.

Wilkinson, L. 2004. Systat 11. Systat Software Inc, San José, USA.

Zapata, R. T.; Arroyo, M. T. K. 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous forest in Venezuela. *Biotropica*, 10:221-230.

Xie, P-W.; Luo, Z-L.; Zhang, D-X. 2012. Syrphid fly pollination of *Guihailiothamnus acaulis* (Rubiaceae), a species with “butterfly” flowers. *Journal of Systematics and Evolution*. 00 (00): 1-8.