

**FENOLOGIA DE FLORAÇÃO, SISTEMA REPRODUTIVO E EFETIVIDADE DE POLINIZAÇÃO DA
ESPÉCIE DISTÍLICA *PSYCHOTRIA CARTHAGENENSIS* JACQ. (RUBIACEAE) EM ÁREAS DE
CERRADO**

Rogério Rodrigues Faria

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ecologia e Conservação, na área de concentração ECOLOGIA.

Orientadora: Dra. Andréa Cardoso de Araújo

Banca examinadora:

Dra. Silvana Buzato – Universidade de São Paulo

Dra. Maria Rosângela Sigrist – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Dra. Aline Pedroso Lorenz Lemke – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Dra. Isabel Alves dos Santos – Universidade de São Paulo

Dra. Cibele Cardoso Castro – Universidade Federal Rural de Pernambuco

**Campo Grande - MS
2010**

Agradecimentos

À Andréa Cardoso Araújo pela longa orientação de 6 anos, com paciência e apoio ao longo de minha jornada.

Ao apoio logístico da EMBRAPA Gado de Corte via Valdemir Antônio Laura e no Parque Estadual do Prosa pelo Pedro Menezes.

À Vali Pott pela identificação das plantas e ajuda na escolha das áreas.

À Camila Aoki e ao Sebastião Laroca pela ajuda com a identificação das abelhas.

Aos membros da banca que muito contribuíram com seus comentários.

Ao Luis Navarro por ter me aceito para a estância na Universidad de Vigo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, pelo suporte necessário à minha formação, da secretaria aos professores e discentes.

Devo meus agradecimentos a FUNDECT e a CAPES pelas bolsas concedidas ao longo destes 4 anos. Além do mais a FUNDECT foi financiadora do projeto e a CAPES financiadora de minha estância na Espanha por intermédio da Bolsa Sandwich.

À Organization for Tropical Studies pela bolsa concedida para realização do curso de campo na Costa Rica.

Também agradeço a uma imensa gama de pessoas, na qual se inclui familiares, amigos, colegas de trabalho, alunos, vizinhos e etc. Enfim pessoas que de alguma forma contribuíram para a concretização deste feito.

Aos meus pais e irmãos, que sempre foram fonte de inspiração e motivação.

Por fim, à minha amada!

Índice

Resumo geral	05
General abstract	06
Introdução geral	07
Referências	09
Capítulo 1. Fenologia de floração e visitantes florais da espécie distílica <i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq. (Rubiaceae) em fragmentos de Cerrado	12
Resumo	13
Abstract	14
Introdução	15
Materiais e métodos	17
Resultados	20
Discussão	21
Referências	28
Figuras e tabelas	35
Capítulo 2. Breeding system in three distylous populations of <i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq. (Rubiaceae) in Brazilian Cerrado	43
Abstract	44
Introduction	45
Materials and methods	46
Results	49
Discussion	50
References	53
Figures e tables	58
Capítulo 3. Sucesso reprodutivo feminino da espécie distílica <i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq. (Rubiaceae) mediado por <i>Apis mellifera</i> e <i>Augochloropsis</i> sp (Apidae)	65
Resumo	66
Abstract	67
Introdução	68
Metodologia	70

Resultados	71
Discussão	72
Referências	74
Figuras e tabelas	79
Considerações finais	84

RESUMO GERAL

A espécie distílica *Psychotria carthagenensis* Jacq. é um arbusto de sub-bosque, distribuída da Costa Rica até a Argentina. Estudos prévios indicam uma ampla gama de variações nos atributos relacionados à distília, sugerindo diferentes estratégias reprodutivas nas diversas populações. Este estudo teve como objetivo (i) avaliar a fenologia de floração de *P. carthagenensis* e a interação com seus visitantes florais; (ii) descrever o sistema reprodutivo de *P. carthagenensis*; (iii) verificar a efetividade dos polinizadores *Apis mellifera* e *Augochloropsis* sp para os morfos florais de *P. carthagenensis*. Entre janeiro de 2008 e janeiro de 2010 foram realizados censos de flores e de polinizadores, experimentos de polinização manual e foi avaliado o efeito de uma única visita de *Apis mellifera* e *Augochloropsis* sp, os polinizadores mais frequentes, na frutificação de *P. carthagenensis* no Parque Estadual do Prosa, Reserva Biológica da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e Reserva Natural da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, todas as populações localizadas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. A floração de *P. carthagenensis* nas três populações ocorreu de outubro a dezembro, com alto grau de sincronia populacional e também entre os morfos florais. As taxas de visitas não diferiram entre morfos florais e apresentaram alta similaridade na composição de espécies de visitantes florais. As populações estudadas apresentaram isoplezia e houve alta reciprocidade no posicionamento de estames e estigmas. As flores de *P. carthagenensis* são autocompatíveis, sendo compatíveis também com plantas do mesmo morfo. Não houveram diferenças significativas entre os morfos quando comparados os dados de frutificação resultantes de visitas de *A. mellifera* e *Algochlopsis* sp e os dados de polinização cruzada. Apesar de ocorrer em populações localizadas em fragmentos isolados e sob influência antrópica, *P. carthagenensis* parece sustentar interações que beneficiam sua reprodução, pela generalização quanto ao uso dos visitantes florais aliada à sua exibição floral sincrônica. Além disso, a quebra do sistema de auto-incompatibilidade apresentada por *P. carthagenensis* pode assegurar a reprodução da espécie na ausência de seus polinizadores.

Palavras-chave: polinização; sucesso reprodutivo; heterostilia; *Psychotria*; polimorfismo floral.

GENERAL ABSTRACT

Psychotria carthagenensis is a distylous understory shrub, distributed from Costa Rica to Argentina. Previous studies indicate a wide range of attributes related to distyly, suggesting different reproductive strategies in different populations. The aim of this study is to evaluate (i) flowering phenology of *P. carthagenensis* and its interactions with its floral visitors; (ii) to describe the breeding system of *P. carthagenensis*; (iii) to verify the pollination effectiveness of *Apis mellifera* and *Augochloropsis* sp. for the floral morphs of *P. carthagenensis*. Between January 2008 and January 2010, censuses of flowers and pollinators were conducted, and experimental hand pollinations and the effect of only one visit of *A. mellifera* and *Augochloropsis* sp in the fruit set of *P. carthagenensis* were evaluated in Parque Estadual do Prosa, Reserva Biológica da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul and Reserva Natural da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, all the populations located in Campo Grande municipality, Mato Grosso do Sul, Brazil. The flowering of *P. carthagenensis* in the three populations occurred from October until December, with high degree of population and between floral morphs synchrony. The visits rates did not differ between floral morphs and presented high similarity in visitors' species composition. The studied populations presented isoplethy and a high degree of reciprocity on the placement of style and stamen; moreover the flowers of *P. carthagenensis* are self-compatible and compatible within plants of the same morph. There were no significative results in both morphs when compared the fruit set resulting from *A. mellifera* and *Augochloropsis* sp visits and cross-and pollination treatment. Despite occurring in populations located in isolated forest fragments under anthropic influence *P. carthagenensis* seems to maintain interactions that benefit its reproduction, through generalization regarding the use of floral visitors associated with its synchronic floral display. Furthermore, breakdown of self-incompatibility system presented by *P. carthagenensis* can ensure reproduction in the absence of its pollinators.

Keywords: pollination; reproductive success; heterostyly; *Psychotria*; floral polymorphism.

INTRODUÇÃO GERAL

A heterostilia é um polimorfismo genético no qual as populações de plantas são compostas de dois (distilia) ou três (tristilia) morfos florais que exibem posicionamento recíproco de anteras e estigmas (Barrett, 1992). Em espécies tipicamente distílicas são observadas flores com estiletes longos e estames curtos, denominadas longistilas; e flores com estilete curto e estames longos, denominadas brevistilas (Barrett & Richards, 1990). O esperado para populações de espécies distílicas é a ocorrência dos morfos em igual proporção (populações isopléticas); porém é comum a existência de populações anisopléticas (populações com desvios da proporção 1:1), e ainda podem ocorrer populações monomórficas (com apenas um dos morfos); por fim populações homostílicas (com a perda da hercogamia recíproca) também existem (Ganders, 1979).

Acompanhado das diferenças morfológicas, as espécies heterostílicas podem apresentar um sistema de incompatibilidade heteromórfico, responsável por impedir a autopolinização e polinizações intra-mórficas (Barrett, 2002). Porém, estudos recentes têm reportado casos de variação no sistema de incompatibilidade entre espécies dentro de um mesmo gênero e entre populações da mesma espécie [e.g., em *Narcissus* (Pérez-Barrales *et al.*, 2006) ou *Lithodora* (Ferrero, 2009)], ou mesmo quebra do sistema de incompatibilidade (eg., Barrett & Shore, 1987; Schoen *et al.*, 1997). Assim, estudos sobre o sistema reprodutivo, a morfometria floral e a razão entre morfos em populações de espécies distílicas são importantes para o entendimento do significado adaptativo deste polimorfismo.

A heterostilia evoluiu em aproximadamente 28 famílias de angiospermas polinizadas por animais, devido a pressões seletivas convergentes associadas à polinização cruzada (Barrett, 2002). Na família Rubiaceae a distilia é uma estratégia de evitação da autopolinização bastante freqüente, principalmente documentada na subfamília Rubioideae e característica da tribo Psychotrieae (Barrett & Richards, 1990).

Uma das possíveis razões para a ocorrência de populações monomórficas, ou de desvios nas razões entre morfos em espécies heterostílicas, é o desempenho dos visitantes

florais (Pérez-Barrales *et al.*, 2010). Isso pode ocorrer devido à ausência de polinizadores especializados (Ornduff 1971; Björkman 1995) e/ou em resposta a alterações no comportamento de forrageamento dos polinizadores (Wolfe & Barrett 1989). Dessa forma, para populações que possuem os dois morfos, a compreensão mais detalhada das relações entre as flores dos diferentes morfos e seus polinizadores é de grande importância. Além disso, a relação entre a oferta de recursos e a frequência de visitas, bem como a efetividade de polinização, são abordagens importantes em estudos sob este enfoque.

A oferta de recursos florais por uma espécie de planta é fortemente relacionada à frequência de visitas, ou seja, uma exibição floral mais intensa pode garantir um aumento na frequência de visitação e conseqüentemente o aumento na produção de frutos e sementes (Fenner 1998; Van Schaik *et al.* 1993; Sakai 2001). No caso de espécies distílicas, a variação na exibição floral pode ser responsável por diferenças entre morfos na taxa de deposição de pólen e no sucesso reprodutivo feminino (Brys & Jacquemyn 2010), pelos efeitos que a exibição floral causa na atratividade e nas taxas de visitas dos polinizadores. Outro parâmetro é o sincronismo de floração entre indivíduos de ambos os morfos, que além de atração de polinizadores, aumentaria as chances de polinização cruzada intermorfo, que é importante na manutenção do sistema heterostílico (Ganders, 1979).

Uma forma de investigar o efeito de determinada espécie de polinizador sobre a produção de frutos e sementes é através de métodos que estimem a efetividade de polinização (Kearns & Inouye, 1994). A efetividade de um polinizador refere-se à sua contribuição na aptidão das plantas, tanto por componentes qualitativos como quantitativos (Herrera 1987; 1989; Moragues & Traveset 2005). Ao visitar flores de espécies distílicas, os polinizadores tendem a carregar pólen em diferentes partes do corpo, devido à hercogamia recíproca (Lloyd & Webb 1992a; Massinga *et al.* 2005) e assim realizar a polinização inter-morfos. Porém, os visitantes florais podem estar atuando como polinizadores de apenas um dos morfos, promovendo fluxo unidirecional de pólen para aquele dado morfo, o que poderia levar a eliminação do outro na população (Bawa & Beach, 1983).

A espécie distílica *Psychotria carthagenensis* Jacq. é um arbusto de sub-bosque, que ocorre desde a Costa Rica até a Argentina (Delprete *et al.* 2005). Estudos prévios com esta espécie indicam uma ampla gama de variações nos atributos relacionados à distília, sugerindo diferentes estratégias reprodutivas (Demétrio & Machado, 2005; Koch *et al.*, 2010; Pereira, 2007; Consolaro *et al.*, 2011). Este estudo foi dividido em três capítulos, sob a forma de artigos científicos. O primeiro trata da fenologia de floração e a relação com seus visitantes florais; o segundo aborda a descrição do sistema reprodutivo de *P. carthagenensis*; o último trata da efetividade de polinização de duas espécies de abelhas em relação aos dois morfos florais de *P. carthagenensis*.

REFERÊNCIAS

- Barrett, S.C.H., Richards, J. H. 1990. Heterostyly in tropical plants. Memories of the New York Botanical Garden 55: 35-61.
- Barrett, S.C.H., Shore, J.S. 1987. Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* complex (Turneraceae). Evolution 41: 340–354.
- Barrett, S.C.H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: Model systems for evolutionary analysis. In: Evolution and Function of Heterostyly (Ed. S.C.H. Barrett), pp. 1-29, Springer-Verlag, Berlin.
- Barrett, S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. Nature Reviews Genetics 3: 274–284.
- 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.
- Björkman, T. 1995. The effectiveness of heterostyly in preventing illegitimate pollination in dish-shaped flowers. Sexual Plant Reproduction 8: 143-146.
- Brys R, Jacquemyn H. 2010. Floral display size and spatial distribution of potential mates affects pollen deposition and female reproductive success in distylous *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). Plant Biology 12: 597–603.

- Consolaro, H.N., Silva, S.S., Oliveira, P.E. 2011. Breakdown of distyly and pin-monomorphism in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). Plant Species Biology 26, 24–32.
- Delprete, P.G., Smith, L.B., Klein, R.M. 2005. Rubiaceae. In: A. Reis (Ed). Flora Ilustrada Catarinense. I Parte – As Plantas/ Monografia. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí: 542-549.
- Demétrio, K.M., Machado, I.C. 2005. Biologia floral, polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria carthagenensis*. Resumos do 56° Congresso Nacional de Botânica. Sociedade Botânica do Brasil. Curitiba.
- Fenner, M. 1998. The phenology of growth and reproduction in plants. Perspectives in Plant ecology, Evolution and Systematics 1: 78-91.
- Ferrero, V. 2009. The ecology and evolution of floral polymorphism in *Lithodora* (Boraginaceae). PhD thesis. University of Vigo, Vigo, Spain. 218p.
- Ganders, F.R. 1979. The biology of heterostyly. New Zealand Journal of Botany 17: 607–635.
- Herrera, C.M. 1987. Components of pollination “quality”: comparative analysis of a diverse insects assemblage. Oikos 50: 79–90.
- Herrera, C.M. 1989. Pollinator abundance, morphology, and visitation rate: analysis of the “quantity” component in a plant–pollinator system. Oecologia 80: 241–248.
- Kearns, C.A., Inouye, D.W. 1994. Techniques for Pollination Biologists. University Press of Colorado. 583p.
- Koch, A.K. , Silva, P.C., Silva, C.A. 2010. Biologia Reprodutiva de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae), espécie distílica de fragmento floresta de mata ciliar, Centro Oeste do Brasil. Rodriguésia 61: 551–558.
- Lloyd D.G., Webb C.J. 1992. The evolution of heterostyly. In: Evolution and Function of Heterostyly (Ed. S.C.H. Barrett), pp. 151-178, Springer-Verlag, Berlin.
- Massinga, P.H., Johnson, S.D., Harder, L.D. 2005. Heteromorphic incompatibility and efficiency of pollination in two distylous *Pentanisia* species (Rubiaceae). Annals of Botany 95: 389–399.

- Moragues, E., Traveset, A. 2005. Effect of *Carpobrotus* spp. on the pollination success of native plant species of the Balearic Islands. Biological Conservation 122: 611–619.
- Ornduff, R. 1971. The reproductive system of *Jepsonia heterandra*. Evolution 25: 300-311.
- Pereira, Z.V. 2007. Rubiaceae Juss. do Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul: florística, sistema reprodutivo, distribuição espacial e relações alométricas de espécies distílicas. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Pérez-Barrales, R., Vargas, P., Arroyo, J. 2006. New evidence for the *Darwinian hypothesis of heterostyly: breeding systems and pollinators in* *Narcissus* sect. *Apodanthi*. New Phytologist, 171: 553–567.
- Pérez-Barrales, R., Vargas, P., Arroyo, J. 2010. Pollinator shifts and the loss of style polymorphism in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae). Journal of Evolutionary Biology, 23: 1117-1128.
- Sakai, S. 2001. Phenological diversity in tropical forests. Population Ecology 43: 77–86.
- Schoen, D.J., Johnston, M.O., L'Heureux, A.M., Marsolais, J.V. 1997. Evolutionary history of the mating system in *Amsinckia* (Boraginaceae). Evolution 51: 1090–1099.
- Van Schaik, C.P., Terborgh, J.W., Wright, S.J. 1993. The phenology of tropical forests: adaptative significance and consequences for primary consumers. Annual Review of Ecology and Systematics. 24:353-377.
- Wolfe, L.M., Barrett, S.C.H. 1987. Pollinator foraging behavior and pollen collection on the floral morphs of tristylous *Pontederia cordata*. Oecologia 74: 347–351.

Capítulo 1. Fenologia de floração e visitantes florais da espécie distílica *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae) em fragmentos de Cerrado

Running head: Polinização em *Psychotria carthagenensis*

Rogério Rodrigues Faria^{1*} & Andréa Cardoso Araújo²

¹Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Caixa Postal 549, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

² Departamento de Biologia. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Caixa Postal 549, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

* Autor para correspondência: Rogério Rodrigues Faria

E-mail: roger.faria@yahoo.com.br

Resumo

Este trabalho teve como objetivo descrever a fenologia de floração de *Psychotria carthagenensis* e descrever a atuação dos visitantes florais, nos níveis de população e de morfos florais. Entre janeiro de 2008 e janeiro de 2010 foram realizados censos de flores e de polinizadores no Parque Estadual do Prosa (20°27'00"S, 54°33'46"W), Reserva Biológica da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (20°29'58"S, 54°36'50"W) e Reserva Natural da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (20°25'41"S, 54°43'03"W). A floração de *P. carthagenensis* nas três populações ocorreu de outubro a dezembro, com alto grau de sincronia populacional e também entre os morfos florais. Não houve diferenças na produção de néctar entre populações e nem entre flores dos diferentes morfos. As taxas de visitas também não diferiram entre morfos florais e apresentaram alta similaridade na composição de espécies de visitantes florais. Dentre as 22 morfoespécies de visitantes registradas, somente três atuaram como pilhadores. *Apis mellifera* foi o principal polinizador nas três populações. Apesar de ocorrer em fragmentos isolados e sob influência antrópica, *P. carthagenensis* parece sustentar interações que beneficiam sua reprodução. Isso poderia ser explicado pela aparente generalização quanto ao uso dos visitantes florais, aliada a sua exibição floral sincrônica, que permite maior atratividade de polinizadores e propicia o fluxo de pólen inter-morfo.

Palavras-chave: distília; polimorfismo floral; fenologia de floração; visitantes florais; *Psychotria*; sincronia no florescimento; polinização

Abstract

The aim of this work was to describe the flowering phenology of *Psychotria carthagenensis* and the actuation of floral visitors, at the population and the morph levels. Between January 2008 and January 2010, flower and pollinators census were conducted in the Parque Estadual do Prosa (20°27'00"S, 54°33'46"W), Reserva Biológica da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (20°29'58"S, 54°36'50"W) and Reserva Natural da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (20°25'41"S, 54°43'03"W). The flowering of *P. carthagenensis* in the three studied populations occurred between October and December, with high degree of synchrony in the populations as well as between floral morphs. The visiting rates did not differ between floral morphs and presented high similarity in composition of floral visitors species, as well as in nectar production. Of the 22 morph species, only three acted as nectar robbers. *Apis mellifera* was the main pollinator in the three populations. Despite occurring in populations located in isolated forest fragments, under anthropic influence, *P. carthagenensis* seems to maintain interactions that benefit its reproduction. This could be explained by the apparent generalization in the use of floral visitors along with its synchronous floral display, which allows greater pollinator attraction and promotes inter-morphs pollen flow.

Keywords: distyly; floral polymorphism; flowering phenology; floral visitors; *Psychotria*; flowering synchrony; pollination.

Introdução

A heterostilia é um polimorfismo genético caracterizado pela ocorrência de dois (distilia) ou três (tristilia) morfos florais em uma dada população (Barrett 1992). Em Rubiaceae, a distilia é principalmente documentada na subfamília Rubioidae e característica da tribo Psychotrieae (Barrett & Richards 1990). Em espécies tipicamente distílicas, as flores longistílicas possuem estiletes longos e estames curtos, e nas brevistílicas o estilete é curto e os estames são longos (Ganders 1979). Além do posicionamento recíproco das anteras e estigmas e a incompatibilidade intra-morfo, que caracteriza o sistema distílico verdadeiro, podem ocorrer outras diferenças morfológicas associadas à distilia como comprimento da corola, morfologia e quantidade dos grãos de pólen, tamanho e morfologia do estigma e das papilas estigmáticas tem sido citadas na literatura (Vuilleumier 1967; Ganders 1979; Barrett & Richards 1990; Hamilton 1990; Castro *et al.* 2004). Decorrente das diferenças morfológicas entre os morfos florais, também podem ocorrer diferenças entre os mesmos, em relação aos vetores de pólen mais efetivos (Bawa & Beach 1983).

A heterostilia tem sido tradicionalmente vista como um mecanismo que promove polinização legítima e reduz o desperdício de pólen (Darwin 1877; Lloyd & Webb 1992ab), sugerindo polinização não-associativa (*disassortative pollination*), ou seja, maior fluxo de pólen para o morfo oposto (Darwin 1877; Charlesworth & Charlesworth 1979; Lloyd & Webb 1992b). Se o fluxo de pólen é simétrico, e ambos os morfos possuem equivalente potencial funcional, é esperado que ambos apresentem equivalente sucesso reprodutivo masculino e feminino (García-Robledo 2008). Em espécies distílicas, diferenças entre morfos no padrão de deposição de pólen nos estigmas são comuns (*ver* Lau & Bosque 2003). De maneira geral, os desvios no padrão de fluxo de pólen em espécies heterostílicas têm sido associados a ausência de polinizadores especializados (Ornduff 1971; Björkman 1995) e/ou alterações no comportamento de forrageamento dos polinizadores (Wolfe & Barrett 1989). Assim, como consequência dessas falhas na polinização, pode ocorrer a perda deste polimorfismo floral, devido a eliminação de um dos morfos da população (Pérez-Barrales & Arroyo 2010). Porém, a

variação na exibição floral pode ser responsável por diferenças entre morfos na taxa de deposição de pólen e no sucesso reprodutivo feminino (Brys & Jacquemyn 2010), pelos efeitos que a exibição floral causa na atratividade e nas taxas de visitas dos polinizadores.

Para as Angiospermas, há um consenso de que a exibição floral afeta a aptidão das plantas via processos reprodutivos como a polinização, desenvolvimento das sementes, dispersão e germinação, e subsequente sobrevivência das plântulas (Fenner 1998; Van Schaik *et al.* 1993; Sakai 2001). Sendo assim, no nível populacional por exemplo, algum grau de sincronia no florescimento é necessário de maneira que a exibição floral e a atratividade para os polinizadores sejam aumentadas e que aumente as chances de cruzamento entre indivíduos (Rathcke & Lacey 1985). No caso de espécies distílicas a sincronia de floração entre indivíduos de ambos os morfos significa que, além de atração de polinizadores, maiores são as chances de polinização cruzada intermorfos, que é importante na manutenção do sistema heterostílico (Ganders 1979).

A espécie distílica *Psychotria carthagenensis* Jacq. é arbusto de sub-bosque que mede de 2-3 metros de altura e ocorre distribuída da Costa Rica até a Argentina (Delprete *et al.* 2005). No Brasil, estudos prévios abordando a morfologia floral e o sistema reprodutivo desta espécie têm registrado grande variação nas características reprodutivas como um caso de homostilia na região Nordeste (Demetrio & Machado 2005); auto-incompatibilidade em uma população anisoplética (Pereira 2007), mas também em uma isoplética (Koch *et al.* 2010), ambos na região Centro-Oeste; caso de autocompatibilidade em uma população monomófica no sudeste (Consolaro *et al.* 2011), e também em populações isopléticas na região Centro-Oeste (Faria, 2011 - Capítulo 2). No entanto a relação entre a fenologia de floração e os visitantes florais ainda não foi explorada no nível de morfos florais para a espécie.

Como se trata de uma espécie distílica, é esperado que os morfos em populações de *Psychotria carthagenensis* exibam sincronia no florescimento, o que permitiria o cruzamento inter-morfos e a manutenção da distilia. Além disso, em caso de exibição floral similar, os visitantes florais poderiam ter iguais probabilidades de encontro com flores de ambos os

morfos. Dessa forma, os objetivos deste trabalho são responder as seguintes questões: 1) Qual o período e a época de florescimento de *P. carthagenensis* em três populações em áreas de Cerrado?; 2) Qual o grau de sincronia no florescimento dos indivíduos de *P. carthagenensis* em cada uma das três populações?; 3) Existe sincronia no florescimento entre os dois morfos florais de *P. carthagenensis*? 4) Há diferença nas taxas de visitação entre os morfos florais de *P. carthagenensis*? 5) Qual o grau de similaridade na composição de espécies de visitantes entre os morfos florais de *P. carthagenensis*?

Materiais e métodos

Área de estudo

As três populações estudadas de *P. carthagenensis* ocorrem em fragmentos de cerrado localizados em áreas protegidas imersas em uma matriz urbana no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Essas áreas distam entre si, em média 12.45 km, e são: Parque Estadual do Prosa (PEP – 135 ha, 20°27'00"S, 54°33'46"W); Reserva Biológica da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS – 35 ha, 20°29'58"S, 54°36'50"W) e Reserva Natural da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Gado de Corte (EMBRAPA – 175 ha, 20°25'41"S, 54°43'03"W). Em todas as áreas estudadas plantas de *P. carthagenensis* ocorrem em solos mais úmidos, próximo a pequenos cursos de água e a razão entre os dois morfos florais é na proporção 1:1 (Faria, R.R. 2011 - Capítulo 2). O clima na região é do tipo Savana Tropical (Aw cf. Köppen 1948), caracterizado por uma pronunciada estação seca de maio a setembro e uma estação chuvosa de outubro a abril. A precipitação anual acumulada é de aproximadamente 1.532mm, e as temperaturas médias anuais estão entre 20-22°C (EMBRAPA-CNPGC 1985). Dados de precipitação acumulada mensal e média da temperatura média mensal para todo o período de estudo foram obtidos na Estação Meteorológica da Universidade para o Desenvolvimento da Região do Pantanal (UNIDERP), e a partir destes dados foi confeccionado um gráfico (Figura 1).

Fenologia de floração e Néctar

Para o estudo da fenologia de floração foram escolhidas ao acaso e posteriormente marcadas 20 plantas de *P. carthagenensis* de cada morfo em cada uma das populações de janeiro de 2008 a janeiro de 2010. O acompanhamento fenológico foi realizado mensalmente. Porém, durante o período de floração da espécie, o número de flores produzidas foi acompanhado quinzenalmente. O padrão de floração, de acordo com a duração e frequência de fenofase, das populações estudadas foi classificado de acordo com Newstrom *et al.* (1994)

Nas três populações estudadas foi coletado o néctar acumulado de cinco flores, em 10 plantas de cada morfo, totalizando 50 flores por morfo, por população. Em todas as populações, as flores utilizadas para medir o néctar foram ensacadas em fase de botão, e no dia seguinte (durante a antese) a partir das 1000 h até as 1200 h foram iniciadas no campo as manipulações das flores. A maioria das observações focais foi realizada no período da manhã, de modo que os valores amostrados refletem a disponibilidade de néctar aos visitantes florais, permitindo relacioná-los a frequência de visitas neste período. Com auxílio de micro-seringa foi aferido o volume, e a concentração de açúcar com o auxílio de refratômetro de bolso (Dafni *et al.* 2005).

Visitantes florais

A taxa de visitação (número de visitas/número de flores observadas/hora) foi calculada para cada censo de visitantes florais nas três populações estudadas. Cada censo foi constituído por observações focais de cinco plantas de cada morfo, também escolhidas ao acaso. Os censos de visitantes foram realizados entre 0700h e 1800h, porém foram predominantes no período da manhã. As observações focais tinham duração de 15 minutos para cada indivíduo focal e foram realizadas a cada duas semanas. Cada durou 75 minutos por morfo e por população. No ano de 2008 foram realizados seis censos e em 2009 foram oito, totalizando 360 horas de observação. Nas plantas focais foram registrados o horário, número de visitas e o resultado das visitas: 1) polinização (visitas legítimas, ou seja, quando os

visitantes contataram anteras e estigma durante as visitas) ou 2) pilhagem (visitas ilegítimas, ou seja, quando não contataram anteras e estigma durante as visitas). Para identificação dos visitantes florais, os espécimes foram capturados durante as visitas com auxílio de puçá e/ou sacos plásticos para posterior identificação até a máxima resolução taxonômica possível.

Análises estatísticas

Para verificar o padrão de floração dos dois morfos florais de *P. carthagenensis* foram montados histogramas circulares com a distribuição de freqüências de indivíduos floridos, separadamente para cada morfo, durante os anos de 2008 e 2009. Para o cálculo da data média de floração de cada população de *P. carthagenensis* e a concentração (r) dos indivíduos em torno desta média foi utilizado o Teste Rayleigh (Z) para distribuições circulares conforme Morellato *et al.* (1989), utilizando o programa Oriana 2.0 (Kovach 2004). O teste de Rayleigh (Z) calcula a probabilidade da hipótese nula, a qual sugere que os dados são distribuídos de maneira uniforme. Deste modo, um valor de probabilidade abaixo do nível de significância (<0.05) indica que os dados não estão distribuídos uniformemente e mostram evidência de uma direção preferida. O comprimento do vetor no gráfico é relacionado com o valor de concentração (variando de 0 a 1), e a seta aponta para o ângulo médio (data média) da distribuição de freqüências (Kovach 2004).

Para avaliar se existem diferenças no volume (μL) e na concentração de açúcares (%) no néctar de flores longistílicas e brevistílicas foi utilizado o teste “t”. As taxas de visitação para ambos os morfos florais foram calculadas para cada censo e comparadas entre morfos pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney com o auxílio do programa Bioestat 4.0 (Ayres *et al.* 2005), separadamente por ano e por população. A similaridade na composição de espécies de visitantes florais entre os morfos de *P. carthagenensis* foi calculada para cada população e para cada ano, utilizando o índice quantitativo de similaridade de Morisita, com o auxílio do programa Biodap (Harmer *et al.* 2001). Para essa análise foram utilizados os dados de

frequência de visitas (número de visitas/ número total de visitas recebidas pelo morfo) de cada espécie de visitante floral.

Resultados

Fenologia de floração e Néctar

A floração de *P. carthagenensis* ocorreu nas três populações estudadas entre os meses de outubro a dezembro, nos dois anos de estudo (Figura 2). Portanto, em nível populacional o padrão de florescimento é anual quanto à frequência e intermediário quanto à duração (cf. Newstrom *et al.* 1994). Os valores de sincronia (r) variaram entre 0.915 e 0.954, e os valores de data média ficaram entre 1° e 19 de novembro. Em todos os casos houve valores significativos nas análises (Tabela 1).

Em 2008 a produção de flores de ambos os morfos de *P. carthagenensis* nas três populações estudadas foi mais elevada que a de 2009 (Figura 3). O pico de produção de flores (média e desvio padrão) em 2008 nas três populações estudadas variou de 34 ± 41.32 flores a 45.45 ± 24.88 flores no morfo longistílico e de 32.05 ± 32.44 flores a 57.6 ± 36.97 flores no morfo brevistílico. Em 2009 os valores máximos de produção de flores (média e desvios padrão) nas três populações variaram de 13.74 ± 15.30 flores a 14.6 ± 15.59 flores no morfo longistílico e de 8.85 ± 14.65 flores a 16.1 ± 20.65 flores no brevistílico (Figura 3).

A média e desvio padrão de concentração de açúcares no néctar de *P. carthagenensis* variaram de $14.4 \pm 5.96\%$ no morfo brevistílico na UFMS até $16.6 \pm 3.03\%$ no morfo longistílico na EMBRAPA (Tabela 2). A média e desvio padrão do volume de néctar de *P. carthagenensis* variaram entre $1.5 \pm 0.68 \mu\text{L}$ na UFMS e $2.4 \pm 0.52 \mu\text{L}$ no PEP (Tabela 2). Quando comparados os valores de volume e concentração entre morfos, não houve diferença significativa em nenhum dos casos (Tabela 2).

Visitantes florais

Em relação às taxas de visitas, no ano de 2008 os maiores valores foram registrados para o morfo brevistílico (0.78) na população da UFMS, 1.05 para as flores brevistilas no PEP e 0.38 para o morfo longistílico na EMBRAPA; com medianas entre 0.16 (UFMS, brevistílicas) e 0.25 (EMBRAPA longistílicas e PEP brevistílicas) (Tabela 3). Em 2009 os maiores valores de taxas de visitas foram 0.19 para o morfo brevistílico na UFMS, 0.57 para o morfo brevistílico no PEP e 0.94 para as flores longistilas na EMBRAPA; com valores de medianas entre zero (UFMS, brevistílicas) e 0.16 (PEP longistílicas) (Tabela 4). Nenhuma das comparações entre morfos, em cada população, apresentaram diferenças significativas (Tabela 3 e 4).

Durante os dois períodos de floração de *P. carthagenensis* (2008 e 2009) avaliados foram registradas 22 morfoespécies de visitantes florais, das quais em cada população foram registradas 14 espécies, porém apenas cinco espécies foram comuns a todas as populações. Os valores do índice de Morisita-Horn indicaram similaridade de 99% na composição de espécies de visitantes florais entre os morfos florais nas populações da UFMS em 2008 e no PEP e EMBRAPA em 2009. A população do PEP em 2008 obteve 91% de similaridade entre morfos, a UFMS em 2009 teve 75% e o menor valor foi para EMBRAPA em 2008 com 21% (Tabela 5). Os visitantes florais mais freqüentes em todas as populações foram *Apis mellifera* com frequência relativa de visitas entre 1.8% e 67.6%, e *Augochloropsis* sp entre 1.8% e 17.6%. De todas as morfoespécies que visitaram *P. carthagenensis* somente três realizaram visitas ilegítimas, sendo duas espécies de formigas e uma de besouro. As formigas *Camponotus* sp e Formicidae sp1 visitavam as flores sem contatar as anteras no morfo brevistilo ou o estigma no longistilo. O Curculionidae sp1 danificava a corola na parte mais próxima à base, provavelmente se alimentando de tecidos florais, e não contactava nenhuma das estruturas reprodutivas (Tabela 5).

Discussão

As populações de *P. carthagenensis* foram altamente sincrônicas em relação ao florescimento, com ocorrência anual e data média de floração em meados de novembro.

Plantas com florescimento do anual e de duração intermediária são aquelas que possuem apenas um episódio principal de floração no período de um ano e fenofase com duração de um a cinco meses (cf. Newstrom *et al.* 1994).

Os indivíduos de *P. carthagenensis* a floração concentrada no início da estação chuvosa, que é coincidente com o período maior abundância de insetos no Cerrado (Pinheiro *et al.* 2002), indicativos de pressões seletivas sobre o seu padrão fenológico tanto por fatores abióticos como bióticos. O começo do período de chuvas normalmente está associado ao aumento da temperatura e fotoperíodo, assim, a atuação conjunta destes fatores pode ser responsável pela aceleração do processo de decomposição da serapilheira, tornando os nutrientes disponíveis para a vegetação, que entra no seu período de maior atividade reprodutiva e vegetativa (Morellato 1992; Morellato & Leitão-Filho 1992). O aumento da intensidade e frequência de chuvas pode atuar como gatilho ambiental, sinalizando a ocorrência de floração; porém, o clima não é o único determinante no período de floração das espécies do Cerrado (Oliveira 1998).

Nota-se nas áreas de estudo que *P. carthagenensis* têm forte exibição floral (obs. pess.) em comparação às demais espécies de sub-bosque, sendo fator crucial para a atratividade dos visitantes florais, que na maioria são insetos que visitam legitimamente suas flores. Indicativos semelhantes de pressões seletivas por fatores bióticos e abióticos foram encontrados para *Psychotria suterella* Muell. Arg. em fragmentos de Mata Atlântica, onde o período de floração esteve relacionado com a época de ocorrência de *Bombus brasiliensis* Lepelletier, bem como a maior pluviosidade e temperatura (Lopes & Buzato 2005). Em Rubiaceae, de maneira geral, a fenologia de floração apresenta diferentes padrões em relação ao período, época e intensidade (e.g Castro & Oliveira 2002; San Martin-Gajardo & Morellato 2003; Pereira *et al.* 2006) e há um consenso que a sua fenologia não sofre restrições filogenéticas (Wright 1991, San Martin-Gajardo & Morellato 2003).

Os valores de data média não são comparáveis entre populações e entre anos, pois este cálculo se baseia principalmente no dia das observações fenológicas (Kovach 2004). No

entanto, as datas médias para as três populações apontam o mês de novembro como o centro da distribuição de frequências dos eventos fenológicos. O período de florescimento de *P. carthagenensis* coincide com o verificado em outras áreas de Cerrado, e reforça o caráter de floração anual para a espécie. No entanto existem divergências quanto à duração da floração dessa espécie, que pode variar em função de fatores regionais. Na região do Triângulo Mineiro-MG, por exemplo, em uma população longistílica, a floração ocorreu entre setembro e dezembro (Consolaro *et al.* 2011). Em uma população de *P. carthagenensis* anisoplética, no Parque Estadual do Invinhema, sul do Mato Grosso do Sul, a floração ocorreu de agosto a janeiro (Pereira 2007). Em uma população isoplética em Tangará da Serra, Mato Grosso, a floração ocorreu de maio a janeiro (Koch *et al.* 2010).

Nas três populações avaliadas neste estudo também foi verificado que em 2009 a proporção de indivíduos em flor e o número médio de flores produzidas por indivíduo foram mais baixos que em 2008. Uma possível explicação pode ser que devido ao alto custo de produção de frutos carnosos, estas plantas podem não estar investindo em reprodução com a mesma intensidade em anos consecutivos. Além disso, a frutificação de *P. carthagenensis* ocorre ao longo de período de tempo extenso, iniciando em dezembro e finalizando em meados de agosto do ano seguinte (L.F.Figueiredo, com.pess). Em espécies com períodos de frutificação extensos, além do custo inerente da produção de frutos, ainda há o custo de defesas contra herbívoros (Howe & Smallwood 1982), de modo que os custos com a reprodução tende a ser maior. Além do mais, devido à forte integração entre a floração e o desenvolvimento dos frutos, é esperado que ocorram relações de compensação (*trade-offs*) no investimento reprodutivo (Primack 1987; Crawley 1997). Deste modo, é possível que as plantas não invistam igualmente em anos consecutivos. Outras espécies arbóreas do Cerrado também apresentam variação na produção de flores e frutos entre ciclos reprodutivos, como *Dipteryx alata* (Oliveira & Sigrist 2008) e *Copaifera langsdorffii* (Pedroni *et al.* 2002), sendo que para a primeira essa variação foi descrita como um fenômeno natural para a população estudada e para a última foi atribuído ao efeito de fatores climáticos. Aparentemente essa variação entre

anos em *P. carthagenensis* não é influenciada por fatores climáticos, pois as temperaturas, tanto para o período da floração quanto para o período que antecede esta fenofase foram similares entre anos. Com relação à precipitação, o ano de 2009 foi mais chuvoso, porém esse foi justamente o ano com exibição floral menos intensa.

Os morfos florais das populações estudadas de *P. carthagenensis* apresentaram sincronia na produção de flores durante todo o período de floração. Essa sincronia, tanto na época quanto na intensidade de florescimento, favorece uma maior visitação floral inter-morfos, pois permite que as probabilidades de encontro do visitante floral com as flores de ambos os morfos sejam equivalentes (em caso de populações isopléticas), fator importante para a estabilidade do sistema heterostílico. Na região de Tangará da Serra-MT houve diferenciação na intensidade do florescimento de *P. carthagenensis*, com o auge da produção de flores brevistilas em outubro e das longistilas em novembro (Koch *et al.* 2010). Semelhanças na oferta de flores pelos dois morfos florais e no sucesso reprodutivo (produção de frutos e sementes) entre morfos foram registradas em *Palicourea longepedunculata* (Rubiaceae) em região de Mata Atlântica no sudeste brasileiro (Silva *et al.* 2010). No entanto, para *Jasminum fruticans* (Oleaceae), no sul da França (Thompson & Dommée 1993), em condições de sincronia no florescimento houve variação no sucesso reprodutivo de cada morfo. O sucesso ora foi maior na fase de investimento na função feminina do morfo longistílico, ora foi maior em flores brevistilas, na fase de transferência de pólen. Apesar de ser importante no papel de atração de visitantes e possibilitar o fluxo de pólen inter-morfos, somente a semelhança na exibição floral entre morfos não garante a similaridade no sucesso reprodutivo dos mesmos (Contreras & Ornelas 1999). Outros fatores, como diferenças morfológicas entre morfos e maior eficiência como doador de pólen por um dos morfos, podem ocasionar variação no sucesso reprodutivo nas funções masculinas e femininas (García-Robledo 2008).

Os morfos longistílicos e brevistílicos de *P. carthagenensis* não apresentaram diferenças na produção de néctar. Tal similaridade na recompensa oferecida aos visitantes florais pode ter sido responsável pela igualdade nos padrões de visitas encontradas nas populações. De

fato não é esperado encontrar preferência por algum morfo desde que não haja variação no volume e concentração de açúcares entre os morfos florais de espécies distílicas (Wolfe & Barrett 1987; Weller 1981), bem como na oferta de flores (Ganders 1979). Na região do Triângulo Mineiro-MG, no sudeste do Brasil, em uma população monomórfica foram registrados valores ligeiramente maiores de concentração e volume ($18.44 \pm 3.77\%$ e $3.5 \pm 1.00 \mu\text{L}$; $n = 9$), em relação aos obtidos para as três populações estudadas (Consolaro *et al* 2011). Esta diferença pode ser explicada pela diferença metodológica, pois no Triângulo Mineiro as medidas de néctar acumulado foram realizadas ao final da tarde (1700 h) e nas populações aqui estudadas essas medidas foram tomadas no período da manhã (1000 h). Tendo em vista que a flor tem a duração de um dia (Koch *et al.* 2010), e que a secreção do néctar é contínua ao longo do dia, poderia ser esperado que o volume acumulado fosse mais alto ao final do dia, comparativamente ao período matutino.

Nas populações estudadas de *P. carthagenensis* foi registrado grande número de visitantes florais, sendo que a maioria deles realiza visitas legítimas como, por exemplo, a abelha exótica *A. mellifera*. Isso indica que a morfologia floral desta espécie não seja restritiva ao tipo de polinizador, sugerindo generalização. Flores altamente especializadas são raras em Rubiaceae, e os polinizadores mais comuns costumam ser as abelhas (Castro & Oliveira 2002) e, para o gênero *Psychotria*, borboletas, beija-flores e vespas são visitantes comumente registrados (Almeida & Alves 2000; Castro & Araújo 2004; Teixeira & Machado 2004). Um sistema de polinização generalista pode ser vantajoso pela reposição espaço-temporal nos polinizadores (Waser *et al.* 1996; Gómez & Zamora 1999), que pode ser importante em situações de perturbações constantes, como ocorre em fragmentos florestais urbanos. Porém, nem sempre a manutenção de um elevado número de visitas significa alto sucesso reprodutivo para as plantas (Gómez 2002). Para atestar a generalização neste sistema seria necessário acessar também a efetividade dos polinizadores.

Além disso, os dois morfos florais de *Psychotria carthagenensis* compartilham praticamente os mesmos visitantes, aparentemente não ocorrendo especialização em direção

a um dos morfos em relação às taxas de visitação. A população EMBRAPA obteve baixa similaridade entre morfos no ano de 2008. Este desvio pode ter ocorrido pelo caráter quantitativo do índice de similaridade (ver Magurran 1988). Os dois visitantes florais mais freqüentes para o morfo brevistilo na EMBRAPA, não foram observados nas flores do morfo longistilo. Além disso, os morfos compartilharam oito das dez espécies registradas para o morfo brevistílico e oito das doze para o longistílico. Para espécies distílicas, compartilhar os mesmos polinizadores, com taxas de visitas semelhantes, permite uma maior probabilidade de fluxo inter-morfos (Husband & Barrett 1992). A especialização em nível de morfos é vista como prejudicial, pois leva ao fluxo assimétrico de pólen e pode resultar em instabilidade do sistema (Wolfe & Barrett 1987).

A ausência de preferência por um morfo em particular, concomitante com a ocorrência de *A. mellifera* como o principal polinizador também foi descrita para *Psychotria tenuinervis* Muell. Arg. em fragmentos florestais na região sudeste (Ramos & Santos 2006; Virilho *et al.* 2007) e *Melochia tomentosa* L. (Malvaceae) no nordeste (Machado & Sazima 2008). Os efeitos de *A. melífera*, assim como de outras abelhas exóticas, na polinização de espécies nativas tem sido amplamente debatidos (ver Goulson 2003) e estudos mais abrangentes e integrados são necessários, visando elucidar os impactos que *A. melífera* pode causar nas espécies de plantas e animais que interagem com ela. No caso das três populações não foi observada a interferência direta de *A. melífera* com outras abelhas e, no que diz respeito às plantas, ela desempenha um papel importante na visitação floral. A relação entre *A. mellifera* e fragmentação é conhecida pelo bom desempenho destas abelhas em áreas perturbadas e fragmentadas (como nas populações de *P. carthagenensis* neste estudo), e pelo fato de a fragmentação poder acelerar a expansão de *A. mellifera* e a amortização dos polinizadores nativos (ver Kearns *et al.* 1998). No entanto, no Chaco Argentino o declínio acentuado na freqüência e riqueza de taxa de visitantes florais nativos em relação ao decréscimo no tamanho dos fragmentos florestais foi de certa forma compensado para algumas espécies vegetais por altas taxas de visitas de *A. mellifera* (Aizen & Feinsinger 1994ab).

Em comparação com *A. mellifera*, a frequência dos demais visitantes florais de *P. carthagenensis* foi baixa, o que pode ser reflexo do fato das populações estarem localizadas em fragmentos urbanos, porém estes podem funcionar como refúgios para estas espécies antófilas. Os fragmentos florestais podem funcionar como “ilhas ecológicas”, que são ambientes favoráveis circundados por uma matriz inadequada (Cane 2001), neste caso construções civis. Na região de Nova Jersey (EUA), por exemplo, houve constatação de que os fragmentos urbanos e suburbanos (locais com entre 25 e 70% de cobertura vegetal) apresentavam maior abundância e riqueza de espécies de abelhas que florestas extensas (locais com mais de 82% de cobertura vegetal) (Winfrey *et al.* 2007). Contudo, Samejina *et al.* (2004) em Saravak, na Malásia, observou que a influencia antrópica foi responsável pelo decréscimo na abundância relativa de espécies de abelhas sem ferrão, em resposta à restrição de locais de nidificação e de fontes de recurso alimentar. De maneira geral, a abundância das espécies de polinizadores diminui pelo efeito da fragmentação, principalmente pela redução, isolamento e alteração do habitat (Kearns *et al.* 1998; Potts *et al.* 2010). Porém, estudos empíricos ainda apontam cenários cada vez mais complexos, com diferentes respostas específicas de cada táxon (e.g. Murren 2002; Brosi *et al.* 2008). No caso dos fragmentos em que se encontram os indivíduos de *P. carthagenensis*, ao mesmo tempo em que se supõe a hipótese de refúgio e de declínio das populações de polinizadores, estudos avaliando não apenas os fragmentos urbanos mas também os localizados em regiões com menor influência antrópica são necessários para o melhor entendimento destas questões.

De acordo com os resultados, as três populações de *P. carthagenensis* além de apresentarem sincronia tanto populacional quanto entre morfos no florescimento, também apresentaram similaridade na concentração e volume de néctar produzido entre morfos, bem como na composição de espécies de visitantes florais e na frequência de visitas. Apesar de ocorrerem em fragmentos isolados e sob influência antrópica, as populações de *P. carthagenensis* avaliadas parecem sustentar interações que beneficiam sua reprodução e a manutenção da distília, talvez pela generalização aparente quanto ao uso dos visitantes florais

aliado a sua exibição floral sincrônica, que permite maior atratividade de polinizadores e permite fluxo de pólen inter-morfos.

Agradecimentos

À V.Pott pela identificação das plantas; B.Zucarelli e L.Franco pelo auxílio no campo; P.Menezes e V.A.Laura pelo apoio logístico nas reservas PEP e EMBRAPA respectivamente; L.Navarro pelos comentários prévios à redação do manuscrito. FUNDECT/CAPES pela bolsa de doutorado a R.R.Faria (41/100.271/2006); CAPES pela bolsa no Programa de Estágio de Doutorando no Exterior concedida a R.R. Faria (1964/10-0); FUNDECT pelo apoio financeiro (23/200.288/2008).

Referências

- Aizen MA, Feinsinger P (1994a) Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a Chaco dry forest, Argentina. *Ecology* **77**: 1779–1990.
- Aizen MA, Feinsinger P (1994b) Habitat fragmentation, native insect pollinators, and feral honey bees in Argentine ‘Chaco Serrano’. *Ecological Applications* **4**, 378–392.
- Almeida EM, Alves MA (2000) Fenologia de *Psychotria nuda* e *P. brasiliensis* em uma área de Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **14**, 335-346.
- Ayres M, Ayres-Júnior M, Ayres DL, Santos AAS (2005) Bioestat software: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas.
- Barrett SCH, Richards JH (1990) Heterostyly in tropical plants. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **55**, 35–61.
- Barrett SCH (1992) Heterostylous genetic polymorphisms: Model systems for evolutionary analysis. In: *Evolution and Function of Heterostyly* (Ed. S.C.H. Barrett), pp. 1-29, Springer-Verlag, Berlin.
- Bawa KS, Beach JH (1983) Self-incompatibility systems in the Rubiaceae of a tropical lowland wet forest. *American Journal of Botany* **70**, 1281–1288.

- Björkman T (1995) The effectiveness of heterostyly in preventing illegitimate pollination in dish-shaped flowers. *Sexual Plant Reproduction* **8**, 143-146.
- Brosi BJ, Daily JC, Shih TM, Oviedo F, Durán G (2008) The effects of forest fragmentation on bee communities in tropical countryside. *Journal of Applied Ecology* **45**, 773–783.
- Brys R, Jacquemyn H (2010) Floral display size and spatial distribution of potential mates affects pollen deposition and female reproductive success in distylous *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *Plant Biology* **12**, 597–603.
- Cane JH (2001) Habitat fragmentation and native bees: a premature verdict? *Conservation Ecology* **5**. URL: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art3/>
- Castro CC, Araújo AC (2004) Distyly and sequential pollinators of *Psychotria nuda* (Rubiaceae) in the Atlantic rain forest, Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **244**, 131–139.
- Castro CC, Oliveira PE (2002) Pollination biology of distylous Rubiaceae in the Atlantic rain forest, SE Brazil. *Plant Biology* **4** 640-646.
- Castro CC, Oliveira PEAM, Alves M (2004) Breeding system and floral morphometry of distylous *Psychotria* L. species in the Atlantic rain forest, SE Brazil. *Plant Biology* **6**, 1–6.
- Charlesworth D, Charlesworth B (1979) A model for the evolution of distyly. *American Naturalist* **114**, 467–498.
- Consolaro HN, Silva SS, Oliveira PE (2011) Breakdown of distyly and pin-monomorphism in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Plant Species Biology* **26**, 24–32.
- Contreras PS, Ornelas JF (1999) Reproductive conflicts of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) a distylous shrub of a Tropical cloud forest in Mexico. *Plant Systematics and Evolution* **219**, 225-241.
- Crawley MJ (1997) Life history and environment. In: *Plant Ecology* (Ed MJ Crawley), pp. 73-131, 2nd Ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Dafni A, Kevan PG, Husband BC (2005) *Practical Pollination Biology*. Enviroquest Ltd. 590p.
- Darwin C (1877) *The different forms of flowers on plants of the same species*. John Murray, London.

- Delprete PG, Smith LB, Klein RM (2005) Rubiaceae. In: A. Reis (Ed). *Flora Ilustrada Catarinense. I Parte – As Plantas/ Monografia*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí: 542-549.
- Demetrio KM, Machado IC (2005) Biologia floral, polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria carthagenensis*. *Resumos do 56º Congresso Nacional de Botânica*. Sociedade Botânica do Brasil. Curitiba.
- EMBRAPA - CNPGC. (1985) *Boletim Agro meteorológico*. Campo Grande.
- Fenner M (1998) The phenology of growth and reproduction in plants. *Perspectives in Plant ecology, Evolution and Systematics* **1**, 78-91.
- Ganders FR (1979) The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* **17**, 607–635.
- García–Robledo C (2008) Asymmetry in pollen flow promotes gender specialization in morphs of the distylous neotropical herb *Arcytophyllum lavarum* (Rubiaceae). *Evolutionary ecology* **22**, 743 - 755.
- Gómez JM (2002) Generalización en las interacciones entre plantas y polinizadores. *Revista Chilena de Historia Natural* **75**, 105-116.
- Gómez JM, Zamora R (1999) Generalization vs specialization in the pollination system of *Hormathophylla spinosa* (Cruciferae). *Ecology* **80**, 796-805.
- Goulson D (2003) Effects of introduced bees on native ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **34**, 1–26.
- Hamilton CW (1990) Variations on a distylous theme in Mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). *Memories of the New York Botanical Garden* **55**, 62-75.
- Harmer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) Past: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Eletronica* **4**, 9p. <http://flok.uio.no/ohammer/past> (accessed 10 October 2006).
- Howe HF, Smallwood J (1982) Ecology of seed dispersal. *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**, 201-228.

- Husband BC, Barrett SCH (1992) Pollinator visitation in populations of tristylous *Eichhornia paniculata* in northeastern Brazil. *Oecologia* **89**, 365–371.
- Kearns CA, Inouye DW, Waser NM (1998) Endangered mutualisms: the conservation of plant–pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**, 83–112.
- Koch AK, Silva PC, Silva CA (2010) Biologia Reprodutiva de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae), espécie distílica de fragmento floresta de mata ciliar, Centro Oeste do Brasil. *Rodriguesia* **61**, 551–558.
- Köppen W (1948) *Climatología*. Editora Fondo de Cultura Econômica, Mexico.
- Kovach WL (2004) *Oriana for Windows*, version 2.0. Kovach Computer Services, Pentraeth.
- Lau P, Bosque C (2003) Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae): an experimental test of the Disassortative Pollen Flow Hypothesis. *Oecologia* **135**, 593–600.
- Lloyd DG, Webb CJ (1992a) The evolution of heterostyly. In: S.C.H. Barrett (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. Springer, Berlin Heidelberg New York: 151-178.
- Lloyd DG, Webb CJ (1992b) The selection of heterostyly. In: S.C.H. Barrett (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. Springer, Berlin Heidelberg New York: 179-207.
- Lopes LE, Buzato S (2005) Biologia reprodutiva de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) e a abordagem de escalas ecológicas para a fenologia de floração e frutificação. *Revista Brasileira de Botânica* **28**, 785-795.
- Machado IC, Sazima M (2008) Pollination and breeding system of *Melochia tomentosa* L. (Malvaceae), a keystone floral resource in the Brazilian Caatinga. *Flora* **203**, 484–490.
- Margurran AE (1988) *Ecological diversity and its measurement*. 1st Ed. Princeton, Princeton University, 179p.
- Morellato LPC, Rodrigues RR, Leitão-Filho HF, Joly CA (1989) Estudo comparativo da fenologia de espécies arbóreas de floresta de altitude e floresta mesófila semidecídua na Serra do Japi, Jundiá, São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* **12**, 85-98.

- Morellato LPC (1992) Sazonalidade e dinâmica de ecossistemas florestais na Serra do Japi. In: *História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil*. Campinas, SP, Editora da Unicamp, p.98-110.
- Morellato LPC, Leitão-Filho HF (1992) Padrões de frutificação e dispersão na Serra do Japi. In: *História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil*. Campinas, SP; Editora da Unicamp, p.112-140.
- Murren CJ (2002) Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia viability and reproductive success. *Journal of Ecology* **90**, 100-107.
- Newstrom LE, Frankie, GW, Baker HG (1994) A new classification for plant phenology based on flowering patterns in Lowland Tropical Rain Forest Trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* **26**, 141-159.
- Oliveira, MIB, Sigrist, MR (2008) Fenologia reprodutiva, polinização e reprodução de *Dipteryx alata* Vogel (Leguminosae-Papilionoideae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **31**, 195-207.
- Oliveira PE (1998) Fenologia e biologia reprodutiva das espécies de cerrado. In: Sano, S.M.; Almeida, S. P. *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p.169-192.
- Ornduff R (1971) The reproductive system of *Jepsonia heterandra*. *Evolution* **25**, 300-311.
- Pedroni F, Sanches M, Santos FAM (2002) Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Leguminosae, Caesalpinoideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **25**, 183-194.
- Pereira ZV, Vieira MF, Carvalho-Okano RM (2006) Fenologia da floração, morfologia floral e sistema de incompatibilidade em espécies distílicas de Rubiaceae em fragmento florestal do sudeste brasileiro. *Revista Brasileira de Botânica* **29**, 471-480.
- Pereira ZV (2007) *Rubiaceae Juss. do Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul: florística, sistema reprodutivo, distribuição espacial e relações alométricas de espécies distílicas*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Pérez-Barrales R, Arroyo J (2010) Pollinator shifts and the loss of style polymorphism in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae). *Journal of Evolutionary Biology* **23**, 1117–1128.
- Pinheiro F, Diniz IR, Coelho D, Bandeira MPS (2002) Seasonal pattern of insect abundance in the Brazilian cerrado. *Austral Ecology* **27**, 132–136.
- Primack RB (1987) Relationships among flowers, fruits, and seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 409-430.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **25**, 345-353.
- Ramos FN, Santos FAM (2006) Floral Visitors and Pollination of *Psychotria tenuinervis* (Rubiaceae): Distance from the Anthropogenic and Natural Edges of an Atlantic Forest Fragment. *Biotropica* **38**, 383–389.
- Rathcke B, Lacey EP (1985) Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**, 179-214.
- Sakai S (2001) Phenological diversity in tropical forests. *Population Ecology* **43**, 77–86.
- Samejina H, Marzuki M, Nagamitsu T, Nakasizuka T (2004) The effects of human disturbance on a stingless bee community in a tropical rainforest. *Biological Conservation* **120**, 577-587.
- San Martin-Gajardo I, Morellato LPC (2003) Fenologia de Rubiaceae do sub-bosque em floresta Atlântica no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **26**, 299-309.
- Silva CA, Vieira MF, Amaral CH (2010) Floral attributes, ornithophily and reproductive success of *Palicourea longepedunculata* (Rubiaceae), a distylous shrub in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* **33**, 207-213.
- Teixeira LAG, Machado IC (2004) Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). *Acta Botânica Brasilica* **18**, 853-862.
- Thompson JD, Dommée B (1993) Sequential variation in the components of reproductive success in the distylous *Jasminum fruticans* (Oleaceae). *Oecologia* **94**, 480-487.

- Van Schaik CP, Terborgh JW, Wright SJ (1993) The phenology of tropical forests: adaptive significance and consequences for primary consumers. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**, 353-377.
- Virilho CB, Ramos FN, Castro CC, Semir J (2007) Floral biology and breeding system of *Psychotria tenuinervis* Muell. Arg. (Rubiaceae) in the Atlantic rain forest, SE Brazil. *Acta Botanica Brasilica* **21**, 879-884.
- Vuilleumier B (1967) The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. *Evolution* **21**, 210–226.
- Waser NM, Chittka L, Price MV, Williams NM, Ollerton J (1996) Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* **77**, 1043–1060.
- Weller S.G. (1981) Pollination biology of heteromorphic populations of *Oxalis alpina* in southeastern Arizona. *Botanical Journal of the Linnean Society* **83**, 189-198.
- Winfrey R, Griswold T, Kremen, C (2007) Effect of human disturbance on bee communities in a forested ecosystem. *Conservation Biology* **21**, 213–223.
- Wolfe LM, Barrett SCH (1987) Pollinator foraging behavior and pollen collection on the floral morphs of tristylous *Pontederia cordata*. *Oecologia* **74**, 347–351.
- Wolfe LM, Barrett SCH (1989) Patterns of pollen removal and deposition in tristylous *Pontederia cordata* L. (Pontederiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* **36**, 317–329.
- Wright SJ (1991) Seasonal drought and the phenology of understory shrubs in a tropical moist forest. *Ecology* **72**, 1643-1657.

Figuras e tabelas

Tabela 1. Valores de data média, sincronia (r) e dos testes de Rayleigh (Z) para três populações de *Psychotria carthagenensis* nos anos de 2008 e 2009, Campo Grande-MS.

Ano	População	Data média	Sincronia (r)	Rayleigh Test (Z)	P
2008	UFMS	03/11/2008	0.924	243.242	<0.0001
	PEP	03/11/2008	0.924	232.113	<0.0001
	EMBRAPA	1º/11/2008	0.931	243.614	<0.0001
2009	UFMS	16/11/2009	0.915	133.983	<0.0001
	PEP	05/11/2009	0.930	90.751	<0.0001
	EMBRAPA	19/11/2009	0.954	118.352	<0.0001

Tabela 2. Resultados de comparações de volume e concentração de néctar entre flores longistílicas (L = 50 flores/ população) e brevistílicas (B = 50 flores/ população) de *P. carthagenensis*, com valores de médias e desvios padrões em três populações no município de Campo Grande-MS, Brasil.

População	Néctar	Média (\pm DP)	T	GI	P
PEP	Volume	L = 2.1 (0.65) B = 2.4 (0.52)	-0.213	98	0.832
	Concentração	L = 15.5 (3.30) B = 14.6 (2.44)	-1.551	98	0.124
EMBRAPA	Volume	L = 2.3 (0.50) B = 2.2 (0.44)	-1.124	98	0.264
	Concentração	L = 16.6 (3.03) B = 15.6 (3.39)	-1.492	98	0.139
UFMS	Volume	L = 1.5 (0.68) B = 1.6 (0.78)	1.059	98	0.292
	Concentração	L = 14.6 (5.87) B = 14.4 (5.96)	-0.169	98	0.866

Tabela 3. Valores de amplitude (valores mínimos e máximos), mediana e dos testes de Mann-Whitney com graus de liberdade e valores de P, comparando taxas de visitas entre morfos longistilos (L) e brevistilos (B) em cada população de *Psychotria carthagenensis* para o ano de 2008, Campo Grande-MS.

		Amplitude	Mediana	U	GI	P
EMBRAPA	L	0.10 - 0.38	0.25	12.000	1	0.34
	B	0.04 - 0.22	0.19			
PEP	L	0.07 - 0.25	0.20	19.000	1	0.87
	B	0.00 - 1.05	0.25			
UFMS	L	0.01 - 0.72	0.19	21.000	1	0.63
	B	0.03 - 0.78	0.16			

Tabela 4. Valores de amplitude (valores mínimos e máximos), mediana e dos testes de Mann-Whitney com graus de liberdade e valores de P, comparando as taxas de visitas entre morfos longistilos (L) e brevistilos (B) em cada população de *Psychotria carthagenensis* para o ano de 2009, Campo Grande-MS.

		Amplitude	Mediana	U	Gl	P
EMBRAPA	L	0.00 - 0.94	0.11	28.000	1	0.67
	B	0.00 - 0.88	0.06			
PEP	L	0.00 - 0.33	0.16	41.500	1	0.29
	B	0.00 - 0.57	0.14			
UFMS	L	0.00 - 0.17	0.00	31.000	1	0.92
	B	0.00 - 0.19	0.04			

Tabela 5. Visitantes florais e frequência relativa de visitas em *Psychotria carthagenensis* nas três populações estudadas (UFMS, PEP, EMBRAPA) nos morfos brevistilos (B) e longistilos (L), durante as florações de 2008 e 2009, Campo Grande-MS. Para cada população e cada ano é apresentado o valor de similaridade entre os morfos florais, representado pelo índice quantitativo de Morisita-Horn.

Visitantes	2008						2009					
	UFMS		PEP		EMBRAPA		UFMS		PEP		EMBRAPA	
	L	B	L	B	L	B	L	B	L	B	L	B
<i>Apis mellifera</i>	29.2	47.3	17.3	67.6	1.8	15.2	32.8	23.2	33.5	49.1	36.7	39.2
<i>Augochloropsis</i> sp.	5.7	3.4		1.8	14.6		1.6	17.6	5.8	3.1	2.7	2.2
<i>Bombus</i> sp1								4.0				
<i>Bombus</i> sp2	1.9	3.0	0.4					3.2				
<i>Bombus</i> sp3					14.6							
<i>Camponotus</i> sp*		1.1	0.4									
<i>Drosophila</i> sp			0.4									
<i>Exomalopsis</i> sp						4.3					1.4	4.9
<i>Hypoleria lavinia</i> (Hewitson, 1855)							3.2					
<i>Lophopedia</i> sp1	0.4	0.4					1.2					
<i>Lophopedia</i> sp2			0.4		9.1	2.4						
<i>Paratetrapedia</i> sp	0.8	0.8	0.4	0.4	3.0	1.2		1.6		0.9	1.6	1.1
<i>Paratrigona lineata</i>			0.7		6.1	3.0			0.9	1.3	3.8	0.5
<i>Tetrapedia</i> sp					0.6	1.8			0.4	1.8	1.1	2.7
<i>Xylocopa</i> sp							9.6					
Curculionidae sp1*		0.4	0.7		0.6							
Culicidae sp1	0.4				1.8	2.4		1.6		1.8		0.3
Formicidae sp1*					0.6							
Lepidoptera sp1		2.7	0.4	3.2				0.8	0.4			
Lepidoptera sp2					5.5	1.2						0.5
Vespidae sp1	1.5		0.4									
NI		1.1	5.6	0.4	1.2	7.3		0.8		0.9	1.1	
Número total de visitas	264		285		164		129		147		360	
Similaridade (Morisita-Horn)	0.99		0.91		0.21		0.75		0.99		0.99	

* Visitantes ilegítimos.

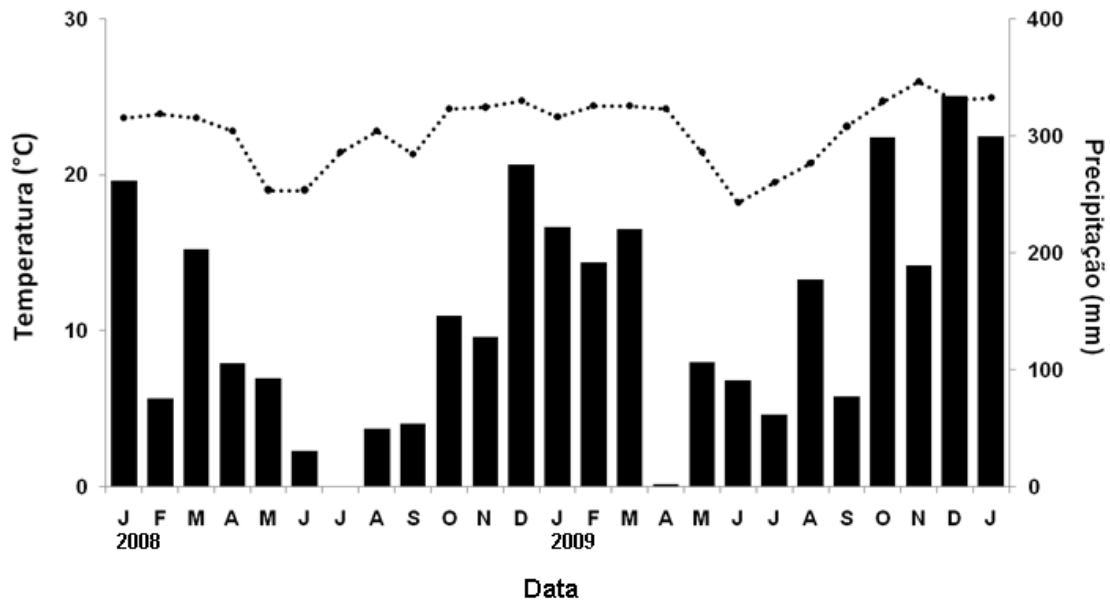


Figura 1. Dados climáticos para o período de janeiro de 2008 a janeiro de 2010, para o município de Campo Grande-MS. A média da temperatura média mensal está representada pela linha tracejada e a precipitação acumulada mensal pelas barras (Fonte: Estação Meteorológica da Universidade para o Desenvolvimento da Região do Pantanal/ UNIDERP).

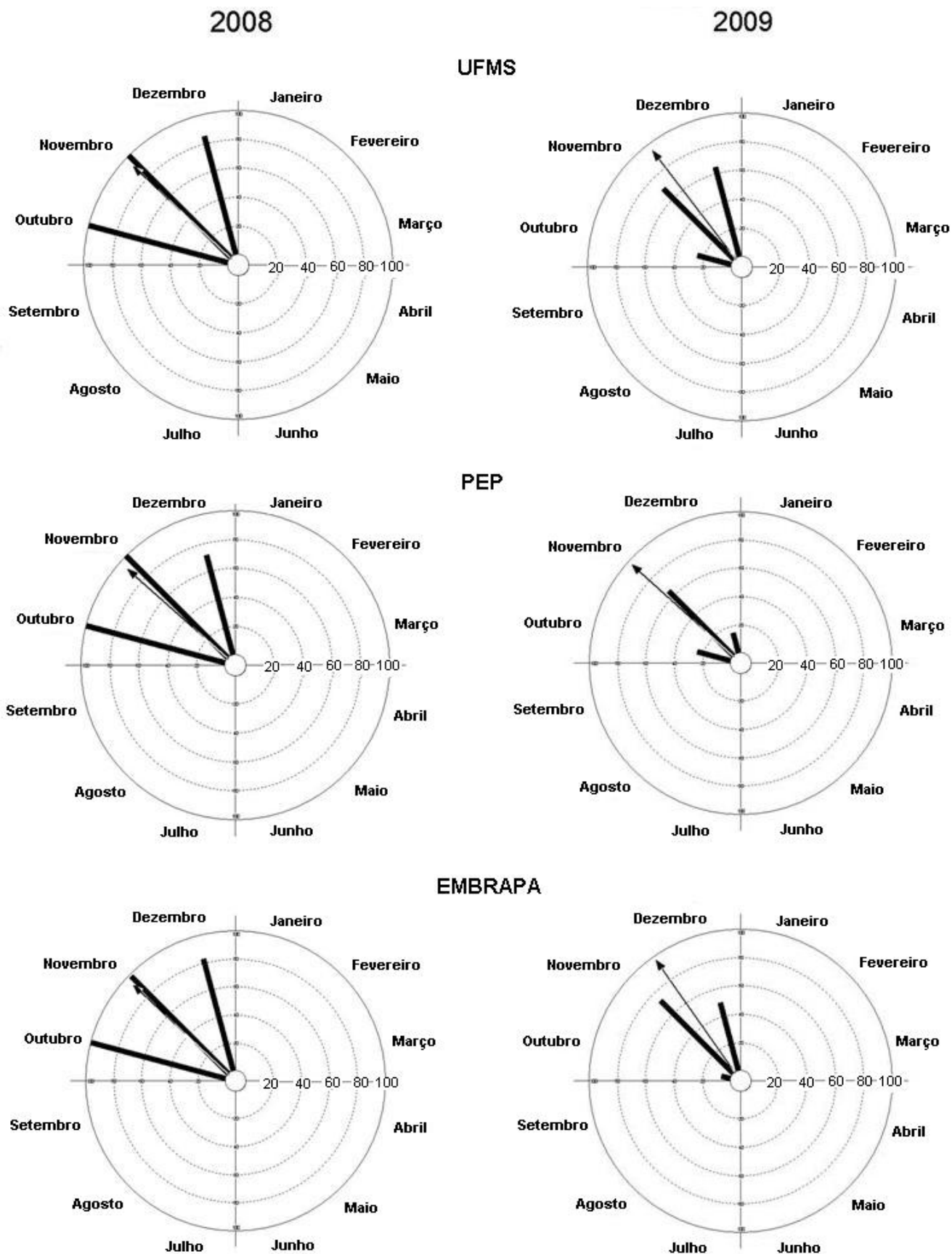


Figura 2. Histograma circular para os períodos de floração de três populações (UFMS, PEP, EMBRAPA) de *Psychotria carthagenensis* para os anos de 2008 e 2009, Campo Grande-MS. Os eixos indicam a escala de freqüências, as barras indicam a freqüência de indivíduos floridos em cada mês, a seta indica a data média de florescimento o comprimento da mesma indica o grau de sincronia da população.

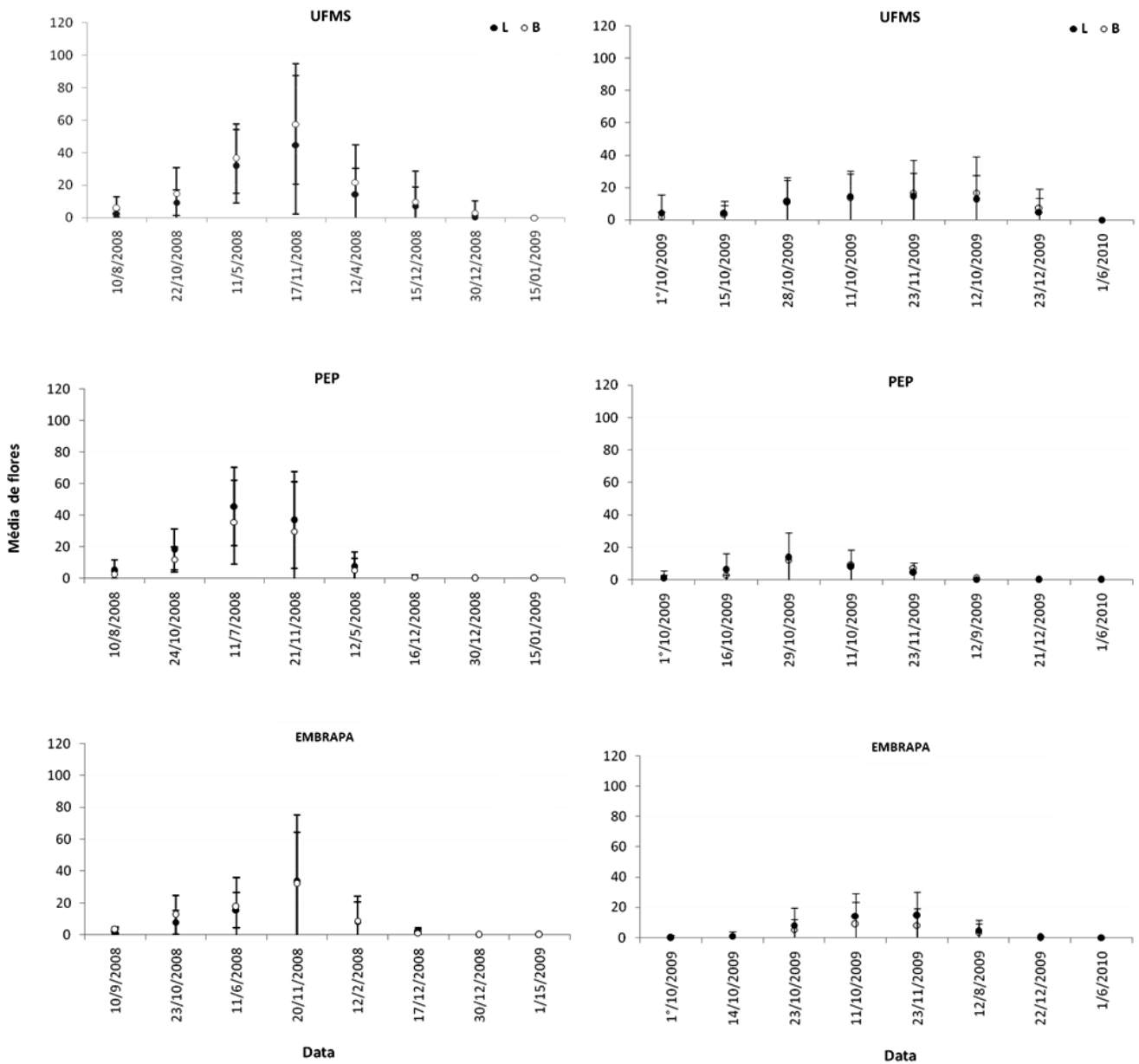


Figura 3. Média de flores e desvio padrão dos morfos brevistilos (B) e longistilos (L) durante a floração de *Psychotria carthagenensis* em três populações (UFMS, PEP, EMBRAPA), nos anos de 2008 e 2009, Campo Grande-MS.

Capítulo 2. Breeding system in three distylous populations of *Psychotria carthagenensis* Jacq.

(Rubiaceae) in Brazilian Cerrado

Short title: Breeding system in *Psychotria carthagenensis*

Faria, R.R.^{1*}; Ferrero, V.²; Navarro, L.²; Araújo, A.C.³

¹ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Caixa Postal 549, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brazil

² Department of Plant Biology and Soil Sciences, Faculty of Biology, University of Vigo, As Lagoas-Marcosende 36200 Vigo, Spain

³ Departamento de Biologia. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Caixa Postal 549, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brazil

* Corresponding author: Rogério Rodrigues Faria

Email address: roger.faria@yahoo.com.br

Address: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Cidade Universitária s/n°. Caixa Postal 549. CEP 79070-900. Campo Grande, MS, Brazil

Phone: +55(67)3345-7342

FAX: +55(67)3345-7342

Abstract

In family Rubiaceae distyly is very common, and a large variation in heterostyly characteristics has been previously documented. The species *Psychotria carthagenensis* also presents variations between populations along its distribution range. For this reason, the goal of this study was to investigate the floral morphology and diallelic incompatibility system of three populations of *P. carthagenensis*. The three studied populations of *P. carthagenensis* occur in forest fragments localized at protected areas in an urban matrix in municipality of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Reciprocal position of style length and stamen height was found in populations and in general short styled flowers were bigger than long styled. All the populations presented a 1:1 morph ratio between short styled and long styled flowers. In respect of the breeding system, flowers of *P. carthagenensis* are self-compatible and compatible within plants of the same morph. There was no pollination limitation in any case, result corroborated by the reproductive indices. Only in one of the populations there were differences in the extent of compatibility between morphs, being the long styled more self-compatible than the short styled morph. The results of this study demonstrate that distyly, associated with high degree of reciprocity between morphs, is not always linked to the heteromorphic incompatibility system. The populations studied have similar proportion of morphs, a high degree of reciprocity between them, compatibility between morphs and autogamy.

Keywords: distyly; floral polymorphism; self-incompatibility system; reciprocal herkogamy; *Psychotria*.

Introduction

Heterostyly is a morphological and genetic plant polymorphism in which populations are composed of different floral morphs that differ reciprocally in the height of their stigmas and anthers (Ganders 1979). Distylous species are characterized by long styled flowers with short stamens and short styled flowers with long stamens (Barrett and Richards 1990). This sexual polymorphism has evolved independently in at least 28 animal-pollinated angiosperm families through convergent selective pressures associated with cross-pollination (Barrett 2002). Heterostyly has been traditionally seen as a mechanism to improve legitimate pollination and reduce pollen wastage (Darwin 1877; Lloyd and Webb 1992ab).

In general, heterostylous species usually possess a sporophytic diallelic incompatibility system, which prevents self- and intra-morph fertilizations (Ganders 1979), and a set of ancillary characters (Vuilleumier 1967; Ganders 1979; Barrett and Richards 1990; Dulberger 1992). In any case, variations in the morphological and/or incompatibility patterns can be found among congeneric species and even populations (Li and Johnston 2001; Castro et al. 2007; Sakai and Wright 2008; Ferrero et al. 2011a,b). It has been reported cases of variations in the system of incompatibility among species within a genus [e.g., in *Narcissus* (Pérez Barrales et al. 2006) or *Lithodora* (Ferrero 2009)], or even breakdown of the incompatibility system associated to reproductive assurance (e.g., Barrett and Shore 1987; Schoen et al. 1997). In respect of variations in incompatibility system, it can result in loss of genetic diversity by inbreeding and/or genetic drift (Barrett and Husband 1990), lower reproductive success, autogamy and even, breakdown of self-incompatibility system (e.g. Richards and Barrett 1992; Weller 1992; Brys et al. 2004). Moreover, there are indications that variations and/or breakdown of the incompatibility system could be correlated to variations in morphological characteristics. In this sense, there are cases of breakdown of incompatibility system in monomorphic populations (Arroyo et al. 2002; Brys et al. 2008; Sakai and Wright 2008; Consolaro et al. 2011) and even loss of herkogamy generating homostylous populations (Washitani et al. 1994; Demetrio and Machado 2005; Shore et al. 2006).

In family Rubiaceae, distyly is very common, mainly in subfamily Rubioidae, and within tribe Psychotrieae (Barrett and Richards 1990). In South America occur 30% around all Rubiaceae species of the world (Chiquieri et al. 2004). Among the Rubiaceae occurring in the Neotropical regions, *Psychotria*

has been well studied in relation to floral biology and breeding systems. Previous studies have described the genus as distylous, although there is not a perfect reciprocal position between anthers and styles in all cases. Moreover, there is a broad spectrum of breeding systems, in which different degrees of self-compatibility can be observed (Bawa and Beach 1983; Faivre and McDade 2001; Castro and Araujo 2004; Castro et al. 2004; Teixeira and Machado 2004; Rossi et al. 2005; Pereira et al. 2006; Sakai and Wright 2008).

Psychotria carthagenensis is a distylous understory shrub with 2-3 meters in high, and its distribution covers from Costa Rica to Argentina (Delprete et al. 2005). It has tubular white flowers arranged on terminal inflorescences. Flowers have a pentalobed calyx and corolla. Flowers started to open at ca 0700h, when the stigma is receptive and the pollen and nectar are also available to floral visitors, and wilted at dusk. The ovary has two ovules, and the fruits are red drupaceous and bear one or two nutlets (R.R. Faria pers. comm.). In Brazil, previous studies addressing floral morphology and breeding systems in *P. carthagenensis* described some cases of homostyly (Demetrio and Machado 2005) in northeast of the country, self-incompatibility (Pereira 2007; Koch et al. 2010) in Middle West, but also self-compatibility (Consolaro et al. 2011) in southeast. Nonetheless, all referred studies are focused on a single population, thus disregarding possible inter-population differences. Additionally, some of such populations were anisoplethic (i.e. present a proportion of morphs different from 1:1) (Pereira 2007), or even monomorphic (Consolaro et al. 2011).

Facing the diversity in reproductive modes existing in the genus (e.g. Bawa and Beach 1983; Faivre and McDade 2001; Castro and Araujo 2004; Castro et al. 2004; Teixeira and Machado 2004; Rossi et al. 2005; Pereira et al. 2006; Sakai and Wright 2008) and at the species level, the goal of this study was to investigate the breeding system, floral morphology and morph ratio of three populations of *P. carthagenensis*, occurring in urban forest fragments, where both floral morphs are common.

Materials and methods

Study areas - The present study was performed on Campo Grande municipality, Mato Grosso do Sul state, Brazil, in domain of Brazilian Cerrado biome. The three chosen populations of *P. carthagenensis*

are placed in fragments of forest at protected areas in an urban matrix: one in a State Park, Parque Estadual do Prosa (PEP, 20°27'00"S, 54°33'46"W), which comprises 135 ha; and two in Biological Reserves, Reserva Biológica da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS, 20°29'58"S, 54°36'50"W) comprising 35 ha, and Reserva Natural da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Gado de Corte (EMBRAPA, 20°25'41"S, 54°43'03"W) with an extension of 175 ha. The average distance among populations is 12.5 km. In all areas *P. carthagenensis* is present in moist soils and nearby to small watercourses. The climate in the region is Tropical Savanna (Aw type cf. Köppen 1948), characterized by a pronounced dry season from May to September and a rainy season from October to April. Mean annual precipitation is 1.532mm, and annual mean temperatures range between 20-22°C (EMBRAPA-CNPQC 1985). In this region, *Psychotria carthagenensis* flowers between October and December. The experiments and data collection were conducted in 2008 and 2009 during the blooming period of *P. carthagenensis*.

Floral morphometrics- In each population of *P. carthagenensis* 102 flowers, 51 per morph, being one flower in each individual, were randomly collected, and these flowers were conserved in alcohol 70%. In the laboratory measures of floral structures were done with a digital caliper to the nearest 0.01mm. Traits measured were: 1) corolla length, 2) diameter of corolla opening, 3) anther length, 4) anther height, 5) style length, 6) ovary length. The herkogamy distance (separation between stamen height and style length) was calculated afterwards (Figure 1). All the measures are presented by means of the coefficient of variation and the arithmetic average. The reciprocity between the sexual whorls of both morphs was calculated for each of the three populations of *P. carthagenensis*, using the index of Sánchez et al. (2008). This index is based on the comparison of the position of every single anther of each flower with the stigmas of all flowers of the opposite morph in a population. When reciprocity is perfect the value of the index is zero. Values depart from zero when reciprocity is not perfect, and are modulated by the average standard deviation of height gaps, so the greater the dispersion, the greater the departure from zero (for a complete description, see Sánchez et al. 2008; computational software available at <http://webs.uvigo.es/plantecology/software.es.html>).

Scatter plots were made to show the variation in the style length and anther height. Plots summarized the individuals in the populations sampled, which were ordered by increasing style length. The other measurements were analyzed with a two-way ANOVA, with morph as fix factor and population as random factor.

Morph ratio - The morph ratio of flowers in the three populations of *P. carthagenensis* was assessed by 10 quadrants 10x10m distributed at random. Within the quadrants, all isolated flowering individuals of each morph, separated more than 50 cm for other individual from the same species, were counted. This separation distance was established after procedure to identify clonal growth. This procedure consists in excavations around a focal plant to identify connections between ramets. In all observations (n=10, per population), it was not observed ramets farther than 30cm. The morph ratio was tested with standard Chi-Square tests against the expectation of 1:1, alpha level at 5%.

Breeding system - To investigate the reproductive system of *P. carthagenensis* the following treatments were employed: 1) hand cross-pollination inter-morph (L×S or S×L), 2) hand cross-pollination intra-morph (L×L or S×S), 3) obligatory autogamy, and 4) agamospermy (bagged and emasculated flowers). Furthermore, we observed natural fruit formation in 5) spontaneous self-pollinated flowers (which were only bagged but not hand pollinated) and 6) control flowers (unbagged flowers during anthesis). Hand crossed flowers (treatments 1, 2 and 3) were emasculated before pollinations and, to avoid herbivory, all treated inflorescences were bagged at the end of experiments. After 4-5 weeks, fruit production was recorded in order to calculate fruit set. In all treatments, the flowers treated were tagged with colored lines and the whole inflorescences were bagged because of the small size of the flowers. In addition, other flowers and buds present in the inflorescence were removed. The six treatments were conducted in a single plant and replicated in twenty plants per morph in each population.

Flower anthesis in *P. carthagenensis* begins around between 0500h and 0600h, in both morphs. At this time, the corolla lobes are totally separated and perpendicularly positioned in relation to floral axis, with reproductive structures exposed. The stigmatic receptivity begins when its lobes are opened. Thus, hand pollinations were made between 0800-1300h and pollen used in the hand pollinations was extracted

from anthers of recently opened flowers. Flower senescence occurs between 1700h and 1800h at the same day (Koch et al. 2010).

For each morph and population several reproductive indices were calculated. These indices were calculated as the ratio between the fruit set obtained in the following treatments: ISI (self-incompatibility index), from obligatory autogamy/inter-morph crosses; ISS (spontaneous self-pollination index), from spontaneous autogamy/obligatory autogamy; and RE (reproductive efficacy index) from control/inter-morph crosses. In all these indices we considered values similar or lower than 0.25 as indicatives of self-incompatibility (in ISI), spontaneity in self-pollination (in IAS) and pollen limitation (in RE) (Sobrevilla and Arroyo 1982).

To test differences among treatments, a G-test was performed between autogamy, intra and inter-morph crosses, with alpha level at 5% (Sokal and Rolf 1995).

Results

Floral morphometrics - Mean values and coefficient of variation (CV) of the measurements of flower traits for the three populations are given in Table 1. In general, short-styled flowers were significantly larger than long-styled ones and flowers from EMBRAPA larger than from UFMS. The higher value of reciprocity between floral whorls was found in PEP (indicated by the lowest value of index) and the lower was recorded in EMBRAPA (Tables 1 and 2). The scatter plots showed separation between style and stamens in the three studied populations (Figure 2).

Morph ratio - A total of 234 individuals in UFMS, 226 at PEP and 375 at EMBRAPA populations were sampled (Table 3). The proportion of morphs in all populations was isoplethic, i.e., not differing of a proportion of 1:1. There was no significant difference from expectations (1:1) in the Chi-Square analysis.

Breeding system - Results of hand-pollination experiments are shown in Figure 3. Agamospermy treatment produced no fruits except for 5% of long-styled individuals in EMBRAPA. In the rest of hand-made treatments, values of fruit set ranged between five to 45%. When compared treatments of autogamy, intra- and inter-morphs, there were no significant differences (except in the population of PEP; Table 4). Fruit set on control flowers of the three populations ranged between one and 30%. Also, there

was no difference between control and inter-morph crosses among all populations, among morphs, and among treatments (Table 4).

Studied populations varied according to the calculated reproductive indices (Sobrevilla and Arroyo 1982). For the ISI index values of 1.50 in PEP, 1.50 in UFMS and 0.71 in EMBRAPA were found. Values for the ISS index were: 0.08 in PEP, 0.40 in UFMS and 0.25 in EMBRAPA. Finally, in respect to the RE index a value of 0.38 was obtained for PEP, 0.43 for UFMS and 1.38 for EMBRAPA. The three populations can be considered as self-compatible, and individuals from EMBRAPA and PEP present the capacity of being spontaneously self-pollinated (ISI and ISS indices similar or lower than 0.25). None of the studied populations showed evidence of pollen limitation (RE higher than 0.25).

Discussion

In this study it is reported variations in breeding system and floral morphology at morph and population levels in three isoplethic populations of *Psychotria carthagenensis*, a large distributed heterostylous plant species in the Neotropical region. The tristylous *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) is also widely distributed and presents variations in breeding system along its distribution. It has been reported as heteromorphic self-incompatible in the Amazon, southern Brazil and northern Argentina (Barrett 1978; Alves dos Santos and Wittmann 2000; Bianchi et al. 2000); as semi-homostylous floral in Costa Rica and southeastern Brazil (Barrett 1978; Alves dos Santos 2002); and as partially self- and heteromorphic compatible in Central Brazil at Pantanal wetland (Cunha and Fischer 2009).

The three analyzed populations showed similar proportions of the two morphs. An isoplethic distribution of morphs has been suggested as consequence of disassortative (inter-morph) mating, being this mating a way of maintenance of heterostyly (Barrett et al. 2000). However, despite the recorded isoplethy in the present study and in another very small population (Koch et al. 2010), a balanced proportion of morphs at the population level does not seem to be a rule for *Psychotria carthagenensis*. In Brazil, L-biased (Pereira 2007; Consolaro 2008), L-monomorphic (Consolaro et al 2011) or even homostylous populations (Demetrio and Machado 2005) have been recorded for this species.

The flowers of *P. carthagenensis* clearly show two distinct morphs, and values of reciprocity between stigmas and stamens are similar to those of other species considered "true" distylous (Sanchez et al. 2008; Ferrero et al. 2011a). Reciprocity is important for the maintenance of heterostyly in plant populations because it has been proposed to increase allogamous pollinations between morphs, reducing disassortative pollen transfer and pollen wastes (Lloyd and Webb 1992ab; Barrett 2002).

In addition, the short-styled flowers of *P. carthagenensis* are generally larger. This pattern has already been shown by other authors (see review in Ganders 1979) and has been associated with the result of the ontogenetic structural arrangement on stamens and styles (Dulberger 1992; Richards and Barrett 1992; Faivre 2000). It has been also associated with reciprocity (Thompson and Dommée 2000). This pattern of floral dimorphism is frequent in Rubiaceae (Faivre and McDade 2001; Castro and Araujo 2004; Castro et al. 2004), although it is not a rule (Consolaro 2008). Moreover, when analyzed this pattern between genera, species and populations it is difficult to assume that between-morph differences are a result of allometric relationships (Ferrero et al. 2011b). For example, for some populations of *Glandora* genera, L corollas were in general wider but shorter than S corollas, while in others it did not occur (Ferrero et al. 2011b).

Thus, from a morphometric viewpoint, degree of reciprocity and the proportion of floral morphs, the analyzed populations of *Psychotria carthagenensis* meet the expectations of any "classic" heterostylous species. However, heterostylous plants usually also present a heteromorphic incompatibility system that prevents selfing and intramorph mating (Barrett 2002). Mather and Wilton (1941) proposed that this incompatibility system is linked to genes responsible for style polymorphisms. However, this is not the case for the studied populations of *P. carthagenensis*, which present reciprocal herkogamy but not incompatibility system. This condition has already been called atypical heterostyly (Dulberger 1992).

Although the studied species appear to be pollinator dependent to produce seeds, results of spontaneous autogamy, obligatory autogamy and intra-morph pollination experiments point to a breakdown in the heteromorphic incompatibility system. Flowers of *P. carthagenensis* are both self-compatible and intra-morph compatible in the three studied populations. Moreover, in the case of EMBRAPA and PEP populations, they also have the possibility of spontaneously self-pollination. Similar

cases, in which the incompatibility systems seem to be unlinked to genes responsible for style polymorphisms, have been found in other taxa (Barrett and Harder 2005). Ferrero (2009) in the family Boraginaceae found support for this latter discovery. In the case of the Rubiaceae, the incompatibility system has been traditionally associated with distylous taxa (e.g. Bawa and Beach 1983). In genus *Psychotria* a wide variety of breeding systems had been reported (Castro and Araujo 2004; Castro et al. 2004; Pereira et al. 2006; Sakai and Wright 2008). In the case of *Psychotria carthagenensis* the results show that in isoplethic populations with high levels of reciprocity between morphs, heteromorphic and self-incompatibility system is broken. The population studied by Koch et al. (2010) is the only record of an isoplethic population with heteromorphic incompatibility for *P. carthagenensis*. Because of the historic fragmentation on the studied areas (due to urban expanding), it sounds reasonable that mating system in these populations would be modified towards an increased level of inbreeding due to self-fertilization (Barrett and Richards 1990; Van Rossum and Triest 2006). Alternatively, one possibility is that the reciprocal herkogamy promotes disassortative mating among morphs even in the absence of heteromorphic incompatibility system (Heuch 1979; Lloyd and Webb 1992b); the isoplethy in morph ratios showed by *P. carthagenensis* populations indicate this.

The results of this study suggest that distyly, associated with high degree of reciprocity between morphs, is not related with heteromorphic incompatibility system, as has traditionally been considered (Mather and Wilton, 1941). Despite having a similar proportion of morphs and a high degree of reciprocity, in the studied populations of *P. carthagenensis* the rupture of the incompatibility system could result advantageous against fluctuations in pollinators' types. To relate environmental and evolutionary factors with breeding system in populations along all the species distribution, it could be important to elucidate the role of each reproductive strategy showed, in the point of view of distyly, as a mechanism to improve legitimate pollination and reduce pollen wastage.

Acknowledgments

The authors thank to V. Pott for identifying the plants; P. Menezes and V.A. Laura for facilitating access to the PEP and EMBRAPA reserves respectively; M.R. Sigrist, A.P.L. Lemke and C.C. Castro for

helpful comments; Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) / Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) provided R.R. Faria with a doctoral fellowship (41/100.271/2006); CAPES provided R.R. Faria with a grant in the Sandwich Doctorate Program (1964/10-0); FUNDECT provided financial support to the study (23/200.288/2008). L.N. was supported by the Spanish Dirección General de Investigación, Ciencia y Tecnología (DGICYT) through the grants CGL2009-10466, the Xunta de Galicia through the grant INCITE09-3103009PR, FEDER funds from the European Union and projects AECID A/023710/09, and CYTED 409AC0369, and the work of V.F. was supported by the Fundación Ramón Areces.

Reference list

- Alves dos Santos I (2002) Flower-visiting bees and the breakdown of the tristylous breeding system of *Eichhornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae). *Biol J Linn Soc* 77: 499–507.
- Alves dos Santos I, Wittmann D (2000) Legitimate pollination of the trimorphic flowers of *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) by *Ancyloscelis gigas* bees (Anthophoridae, Apoidea). *Plant Syst Evol* 223: 127–137.
- Arroyo J, Barrett SCH, Hidalgo R, Cole WW (2002) Evolutionary maintenance of stigma-height dimorphism in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae). *Am J Bot* 89: 1242–1249.
- Barrett SCH (1978) Floral biology of *Eichhornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae). *Aquat Bot* 5: 217–228.
- Barrett SCH (2002) The evolution of plant sexual diversity. *Nat Rev Genet* 3: 274–284.
- Barrett SCH, Jesson LK, Baker AM (2000) The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. *Ann Bot* 85: 253–265.
- Barrett SCH, Harder LD (2005) The evolution of polymorphic sexual systems in daffodils (*Narcissus*). *New Phytol* 165: 45–53.
- Barrett SCH, Husband BC (1990) Variation in outcrossing rates in *Eichhornia paniculata*: the role of demographic and reproductive factors. *Plant Species Biol* 5: 41–55.
- Barrett SCH, Richards JH (1990) Heterostyly in tropical plants. *Mem New York Botan G* 55: 35–61.

- Barrett SCH, Shore JS (1987) Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* complex (Turneraceae). *Evolution* 41: 340–354.
- Bawa KS, Beach JH (1983) Self-incompatibility systems in the Rubiaceae of a tropical lowland wet forest. *Am J Bot* 70: 1281–1288.
- Bianchi M, Vesprini J, Barrett SCH (2000) Trimorphic incompatibility in *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae). *Sex Plant Reprod* 12: 203–208.
- Brys R, Jacquemyn H, Endels P, Van Rossum F, Hermy M, Triest L and De Blust G. (2004) Reduced reproductive success in small populations of the self-incompatible *Primula vulgaris*. *J Ecol* 92: 5–14.
- Brys R, Jacquemyn H, Beeckman T (2008) Morph-ratio variation, population size and female reproductive success in distylous *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *J Evol Biol* 21: 1281–1289.
- Castro CC, Araujo AC (2004) Distyly and sequential pollinators of *Psychotria nuda* (Rubiaceae) in the Atlantic rain forest, Brazil. *Plant Syst Evol* 244: 131–139.
- Castro CC, Oliveira PEAM, Alves M (2004) Breeding system and floral morphometry of distylous *Psychotria* L. species in the Atlantic rain forest, SE Brazil. *Plant Biol* 6: 1–6.
- Castro S, Loureiro J, Santos C, Ater M, Ayensa, G, Navarro, L (2007) Distribution of flower morphs, ploidy level and sexual reproduction of invasive weed *Oxalis pes-caprae* in the western area of the Mediterranean Region. *Ann Bot* 99: 507–517.
- Chiquieri A, Di Maio FR, Peixoto AL (2004) A distribuição geográfica da família Rubiaceae Juss. na Flora Brasiliensis de Martius. *Rodriguésia* 55: 47–57.
- Consolaro HN (2008) A distília em espécies de Rubiaceae do bioma Cerrado. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília.
- Consolaro HN, Silva SS, Oliveira PE (2011) Breakdown of distyly and pin-monomorphism in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Plant Species Biol* 26: 24–32.
- Cunha NL, Fischer EA (2009) Breeding system of tristylous *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) in the southern Pantanal, Brazil. *Plant Syst Evol* 280: 53–58.
- Darwin C (1877) The different forms of flowers on plants of the same species. John Murray, London.

- Delprete PG, Smith LB, Klein RM (2005) Rubiaceae. In: Reis A (Ed). Flora Ilustrada Catarinense. I Parte – As Plantas/ Monografia. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, pp. 542–549
- Demetrio KM, Machado IC (2005) Biologia floral, polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria carthagenensis*. *Resumos do 56º Congresso Nacional de Botânica*. Sociedade Botânica do Brasil. Curitiba.
- Dulberger R (1992) Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In: Barrett SCH (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 41–84.
- EMBRAPA - CNPQC. (1985) Boletim Agrometeorológico. Campo Grande.
- Faivre AE (2000) Ontogenetic differences in heterostylous plants and implications for development from a herkogamous ancestor. *Evolution* 54: 847–858.
- Faivre AE, McDade LA (2001) Population-level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of anthers and stigmas characterize heterostyly? *Am J Bot* 88: 841–853.
- Ferrero V (2009) The ecology and evolution of floral polymorphism in *Lithodora* (Boraginaceae). PhD thesis. University of Vigo.
- Ferrero V, Castro S, Sánchez JM, Navarro L (2011a). Stigma-anther reciprocity, pollinators, and pollen transfer efficiency in populations of heterostylous species of *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). *Plant Syst Evol* 291: 267–276.
- Ferrero V, Chapela I, Arroyo J, Navarro L (2011b). Reciprocal style polymorphisms are not so easily categorized: the case of heterostyly in *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). *Plant Biol*: 13: 7–18.
- Ganders FR (1979) The biology of heterostyly. *New Zeal J Bot* 17: 607–635.
- García–Robledo C, Mora F (2007) Pollination biology and the impact of floral display, pollen donors and distyly on seed production in *Arcytophyllum lavarum* (Rubiaceae). *Plant Biol* 9: 453–461.
- Heuch I (1979) Equilibrium populations of heterostylous plants. *Theor Popul Biol* 15: 43–57.

- Koch AK, Silva PC, Silva CA (2010) Biologia reprodutiva de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae), espécie distílica de fragmento florestal de mata ciliar, Centro Oeste do Brasil. *Rodriguésia* 61: 551–558.
- Köppen W (1948) *Climatología*. Editora Fondo de Cultura Económica, Mexico.
- Li P, Johnston, MO (2001) Comparative floral morphometrics of distyly and homostyly in three evolutionary lineages of *Amsinckia* (Boraginaceae). *Can J Bot* 79: 1332–1348.
- Lloyd DG. and Webb CJ (1992a) The evolution of heterostyly. In: Barrett SCH (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 151–178.
- Lloyd DG and Webb CJ (1992b) The selection of heterostyly. In: Barrett SCH (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 179–207.
- Mather K, Wilton D (1941) Adaptation and counter-adaptation of the breeding system in *Primula*. *Ann Bot* 5: 297–311.
- Pereira ZV, Vieira MF, Carvalho-Okano RM (2006) Fenologia da floração, morfologia floral e sistema de incompatibilidade em espécies distílicas de Rubiaceae em fragmento florestal do sudeste brasileiro. *Rev Bras Bot* 29: 471–480.
- Pereira ZV (2007) Rubiaceae Juss. do Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul: florística, sistema reprodutivo, distribuição espacial e relações alométricas de espécies distílicas. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas.
- Pérez-Barrales R, Vargas P, Arroyo J (2006) New evidence for the Darwinian hypothesis of heterostyly: breeding systems and pollinators in *Narcissus* sect. *Apodanthi*. *New Phytol* 171: 553–567.
- Richards JH, Barrett SCH (1992) The development of heterostyly. In: Barrett SCH (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 85–127.
- Rossi AAB, Olliveira LO, Vieira MF (2005) Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Rev Bras Bot* 28: 285–294.
- Sakai S, Wright J (2008) Reproductive ecology of 21 coexisting *Psychotria* species (Rubiaceae): when is heterostyly lost? *Biol J Linn Soc* 93: 125–134.

- Sánchez JM, Ferrero V, Navarro L (2008) A new approach to the quantification of degree of reciprocity in distylous (*sensu lato*) plant populations. *Ann Bot* 102: 463–472.
- Schoen DJ, Johnston MO, L'Heureux AM, Marsolais JV (1997) Evolutionary history of the mating system in *Amsinckia* (Boraginaceae). *Evolution* 51: 1090–1099.
- Shore JS, Arbo MM, Fernández, A (2006) Breeding system variation, genetics and evolution in the Turneraceae. *New Phytol* 171: 539–551.
- Sobrevilla C, Arroyo MTK (1982) Breeding systems in a montane tropical cloud forest in Venezuela. *Plant Syst Evol* 140: 19–37.
- Sokal RR, Rolf JF (1995) *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. W.H. Freeman, New York.
- Teixeira LAG, Machado IC (2004) Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). *Acta Bot Bras* 18: 853–862.
- Thompson JD, Dommée B (2000) Morph-specific patterns of variation in stigma height in natural populations of distylous *Jasminum fruticans*. *New Phytol* 148: 303–314.
- Van Rossum F, Sousa SC, Triest L (2006) Morph-specific differences in reproductive success in the distylous *Primula veris* in a context of habitat fragmentation. *Acta Oecol* 30: 426–433.
- Vuilleumier BS (1967) The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. *Evolution* 21: 210–226.
- Washitani I, Osawa R, Namai H, Niwa M (1994) Patterns of female fertility in heterostylous *Primula sieboldii* under severe pollinator limitation. *J Ecol* 82: 571–579.
- Weller SG (1992) Evolutionary modifications of tristylous breeding systems. In: Barrett SCH (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 247–272.

Tables and figures

Table 1. Corolla length, corolla opening, anther length, anther height, stigma height, ovary length, herkogamy distance and Reciprocity values obtained at the three studied populations of *Psychotria carthagenensis*. Values for long-styled (L, n= 51 per population) and short-styled (S, n= 51 per population) flowers are given in mm as arithmetic mean (Coefficient of variation), except in the case of index of reciprocity.

Population	Corolla length		Corolla opening		Anther length		Anther height		Stigma height		Ovary length		Herkogamy distance (mm)		Reciprocity
	(mm)		(mm)		(mm)		(mm)		(mm)		(mm)		(mm)		
	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	
EMBRAPA	5.017	5.375	1.600	1.775	1.007	1.178	4.652	7.094	6.493	4.454	1.223	1.208	1.854	2.504	0.025
	(12.7)	(12.2)	(14.9)	(28.1)	(10.5)	(13.0)	(9.7)	(0.134)	(10.1)	(14.3)	(14.7)	(14.5)	(30.9)	(26.1)	
PEP	4.901	5.337	1.811	1.880	0.849	1.128	4.434	7.446	7.119	4.579	1.070	1.072	2.336	2.570	0.020
	(15.0)	(12.1)	(24.6)	(11.8)	(11.6)	(14.8)	(13.6)	(11.4)	(12.9)	(11.5)	(16.9)	(14.8)	(28.4)	(35.4)	
UFMS	4.536	4.884	1.660	1.652	1.059	1.219	4.128	6.711	6.507	4.236	1.106	1.064	2.434	2.716	0.024
	(11.4)	(13.9)	(15.6)	(14.5)	(11.0)	(12.1)	(11.7)	(11.7)	(12.9)	(13.4)	(15.0)	(15.6)	(23.4)	(22.6)	

Table 2. Results of the two-way ANOVAs for the comparisons of corolla length, corolla opening, anther length, ovary length and herkogamy distance long styled (n= 51 per population) and short styled flowers (n= 51per population), and populations of *Psychotria carthagenensis*. Values differ significantly at *P<0.05 and **P<0.01; n.s. difference.

	df	Corolla length (mm)			Corolla opening (mm)			Anther length (mm)			Ovary length (mm)			Herkogamy (mm)		
		Mean-square	F	P	Mean-square	F	P	Mean-square	F	P	Mean-square	F	P	Mean-square	F	P
Morph	1	11.066	26.277	**	0.466	4.120	*	3.169	176.378	**	0.026	0.897	n.s	11.562	26.014	**
Population	2	6.957	16.520	**	1.053	9.312	**	0.605	33.676	**	0.65	22.108	**	4.197	9.444	**
Mor * Pop	2	0.06	0.142	n.s	0.215	1.899	n.s	0.11	6.097	**	0.013	0.434	n.s	1.318	2.966	*
Error		0.421			0.113			0.018			0.029			0.444		

Table 3. Abundance of Long- (L) and Short-styled (S) individuals, and values of Chi-Square test for deviations from isoplethy in the morph ratio in each of the three studied populations of *Psychotria carthagenensis*, Mato Grosso do Sul, Brazil.

	S abundance	L abundance	Chi-Square
PEP	126	100	$\chi^2 = 2.991$, n.s.
UFMS	127	107	$\chi^2 = 1.709$, n.s.
EMBRAPA	198	177	$\chi^2 = 1.776$, n.s.

Table 4. Results of G-test with degrees of freedom and p-value, between autogamy, intra-morph and inter-morph crosses; and results of G-test with degrees of freedom and p-value, between Control and Inter-morph crosses for *Psychotria carthagenensis* in the three studied populations, Mato Grosso do Sul, Brazil.

	Autogamy vs. Intra vs. Inter			Control vs. Inter-morph		
	G-test	Df	P	G-test	Df	P
EMBRAPA	3.83	2	0.16	0.121	1	0.73
UFMS	1.78	2	0.41	0.080	1	0.78
PEP	6.90	2	0.03	0.249	1	0.62
Population	6.67	4	0.18	3.576	2	0.17
Treatment	1.27	2	0.53	0.102	1	0.75
Population*Treatment	17.52	10	0.06	10.328	6	0.11

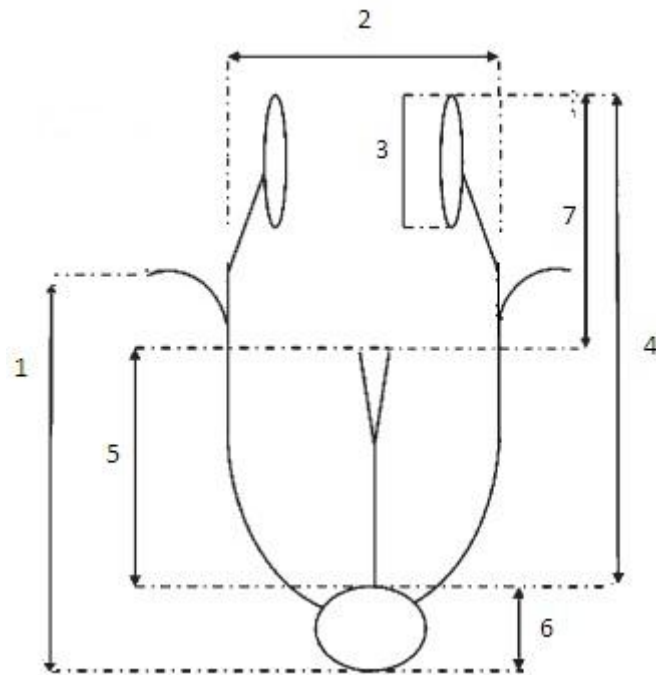


Figure 1. Numbers correspond to the morphometric measures carried in each floral morph of *Psychotria carthagenensis*: 1) corolla length, 2) corolla opening, 3) stamen length, 4) anther height, 5) style length, 6) ovary length, and 7) Herkogamy distance separation was calculated afterwards. Adapted from García-Robledo and Mora (2007).

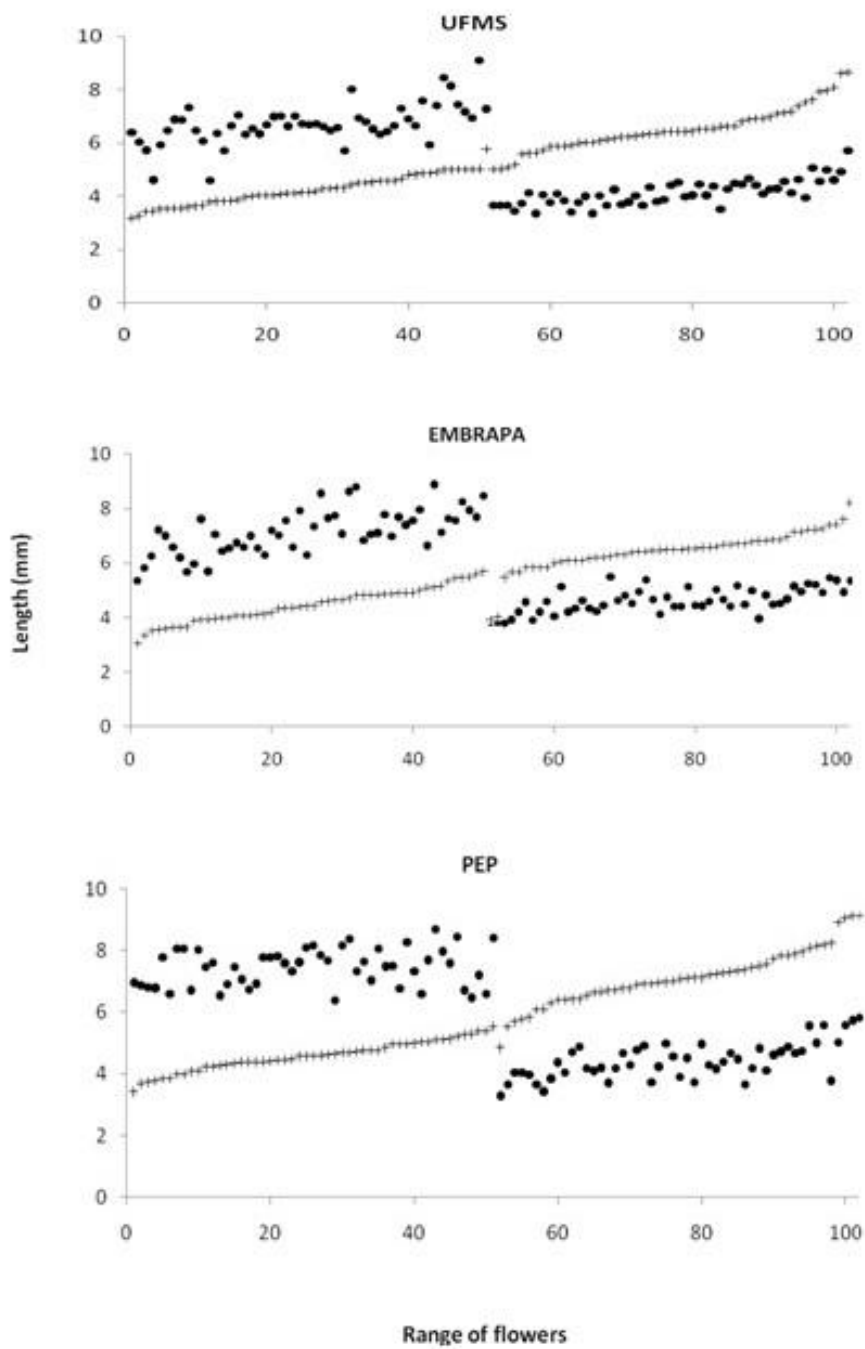


Figure 2. Variation in the style length (+) and mean anther height (•) in three populations of *Psychotria carthagenensis*, Mato Grosso do Sul, Brazil. Plots summarized the individuals in the populations sampled, which are ordered by increasing style length.

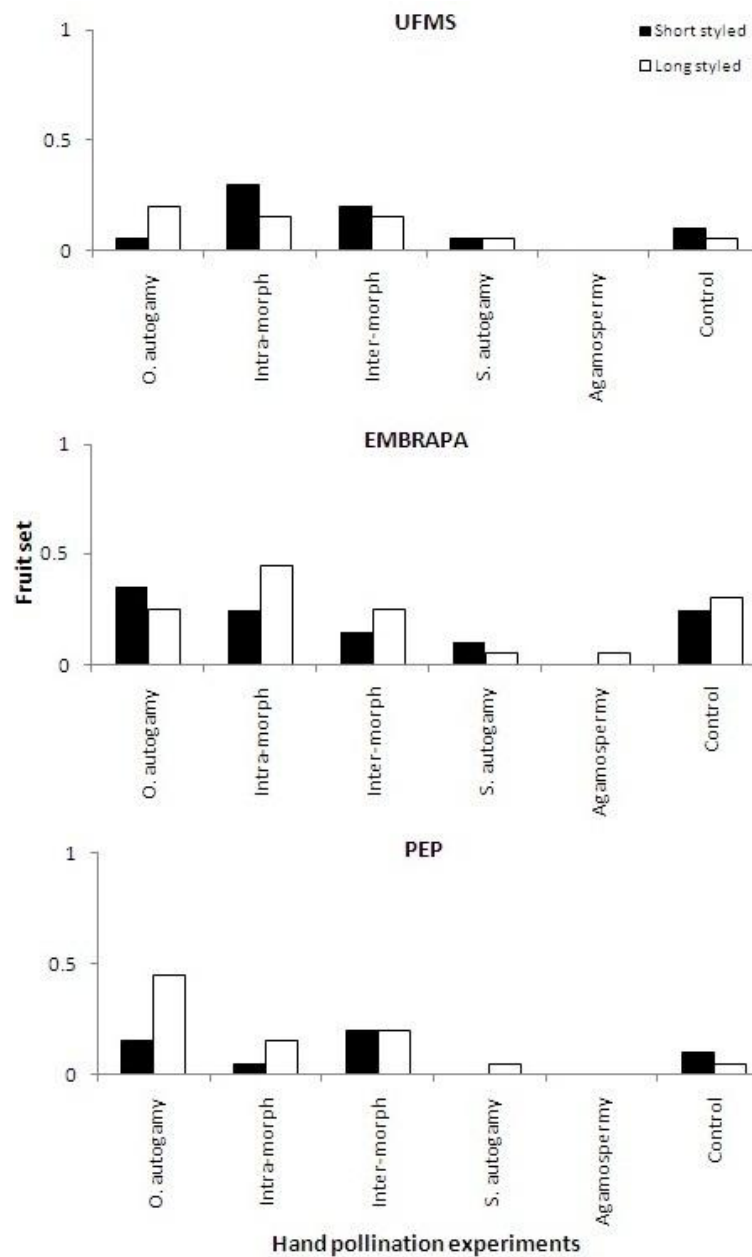


Figure 3. Fruit set after hand pollination treatments: O. autogamy (hand self-pollination), Intra-morph (hand cross-pollination intra-morph), Inter-morph (hand cross-pollination inter-morph), S. autogamy (spontaneous self-pollinated flowers), Agamospermy (bagged and emasculated flowers), Control (without any treatment and free access to floral visitors) in three populations of *Psychotria carthagenensis*, Mato Grosso do Sul, Brazil (n= 20 flowers per treatment/ morph/ population).

Capítulo 3. Sucesso reprodutivo feminino da espécie distílica *Psychotria carthagenensis* Jacq.

(Rubiaceae) mediado por *Apis mellifera* (Apidae) e *Augochloropsis* sp (Halictidae)

Short title: Sucesso reprodutivo em *Psychotria carthagenensis*

Rogério Rodrigues Faria^{1*} & Andréa Cardoso Araújo²

¹Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Caixa Postal 549, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

² Departamento de Biologia. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Caixa Postal 549, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

* Autor para correspondência: Rogério Rodrigues Faria

E-mail: roger.faria@yahoo.com.br

Endereço: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Cidade Universitária s/n°. Caixa Postal 549. CEP 79070-900. Campo Grande, MS, Brazil

Telefone: +55(67)3345-7342

FAX: +55(67)3345-7342

A ser submetido à Plant Species Biology

Resumo

A efetividade de um polinizador comumente inclui desde seu comportamento de visitas até a fertilização do óvulo no ovário das plantas visitadas. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito de uma única visita, realizada pelas abelhas *Apis mellifera* e *Augochloropsis* sp, na taxa de formação de frutos da espécie distílica *Psychotria carthagenensis*. Entre novembro e dezembro de 2009, foram conduzidos os experimentos de efetividade de polinização no Parque Estadual do Prosa (PEP - 135ha, 20°27'00"S, 54°33'46"W), Reserva Biológica da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS - 35ha, 20°29'58"S, 54°36'50"W) e Reserva Natural da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Gado de Corte (EMBRAPA - 175ha, 20°25'41"S, 54°43'03"W). Em cada uma das três populações estudadas, foram selecionadas ao acaso 30 flores virgens longistílicas e 30 brevistílicas, totalizando assim 60 flores para o experimento com cada espécie de abelha em cada população. Após uma única visita de *Apis mellifera* e *Augochloropsis* sp as flores foram ensacadas para o acompanhamento da frutificação. Os resultados dos experimentos foram comparados, para cada um dos morfos florais, com os dados de polinização manual cruzada (inter-morfos) por meio de teste G. Não houve diferença significativa na frutificação em nenhum dos morfos quando comparada a taxa de frutificação após uma visita de *A. mellifera* e de *Augochloropsis* sp com os dados de polinização cruzada. De acordo com os resultados deste estudo, sob condições naturais, uma única visita dessas espécies de abelhas em flores de *P. carthagenensis* é suficiente para o êxito reprodutivo feminino, para ambos os morfos florais.

Palavras-chave: distílica; polinização; hercogamia; *Psychotria*; melitofilia

Abstract

The pollinator effectiveness commonly includes since its visit behavior until the ovule fertilization in the ovary of plants. The aim of this study was to verify the effect of a single visit, made by *Apis mellifera* and *Augochloropsis* sp bees, in the fruit set of the distylous *Psychotria carthagenensis*. Between November and December 2009, experiments of pollination effectiveness were conducted in Parque Estadual do Prosa (PEP - 135ha, 20°27'00"S, 54°33'46"W), Reserva Biológica da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS - 35ha, 20°29'58"S, 54°36'50"W) and Reserva Natural da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Gado de Corte (EMBRAPA - 175ha, 20°25'41"S, 54°43'03"W). In each of the three studied populations, it was selected, by chance, 30 virgin longistilic and 30 brevistilic flowers, totaling 60 flowers in each population for the experiment with each bee species. After only one visit of *A. mellifera* and *Augochloropsis* sp, these flowers were bagged to accompany the fruit set. Results of experiments were compared, for each of the floral morphs, with results of hand cross-pollination (inter-morph) using G-test. There was no significative difference in both morphs when compared the fruit set followed by *A. mellifera* and *Augochloropsis* sp visits and cross pollination treatment. According with results of this study, under natural conditions, one single visit of the observed bees in both floral morphs of *P. carthagenensis* is sufficient to achieve reproductive success in the female function.

Keywords: distyly; pollination; herkogamy; *Psychotria*; melittophily

Introdução

Distília é um dimorfismo que se caracteriza pela presença de dois morfos florais e envolve hercogamia recíproca, um sistema de incompatibilidade heteromórfico e um conjunto de caracteres morfológicos e fisiológicos (Ganders 1979). Trata-se de um polimorfismo genético (heterostília), no qual se inclui também a tristília, que se caracteriza pela presença de três morfos florais (Barrett 2002). Os morfos florais distílicos são identificados pelo posicionamento recíproco das estruturas reprodutivas, no qual as flores brevistilas apresentam estilete curto e estames longos, e as longistilas apresentam estames curtos e estilete longo (Barrett & Richards 1990). Essa separação espacial das estruturas reprodutivas, denominada hercogamia recíproca, é um mecanismo que sugere evitação de autopolinização e de polinizações intra-morfos (Darwin 1877; Lloyd & Webb 1992b), favorecendo assim cruzamentos inter-morfos. Com base nesta premissa, vários estudos têm demonstrado a importância da atuação dos polinizadores na manutenção deste polimorfismo (e.g. Arroyo *et al.* 2002; Thompson *et al.* 2003; Barrett *et al.* 2004; Pérez-Barrales *et al.* 2007). A falha na manutenção do polimorfismo pode ocasionar a perda da hercogamia recíproca (homostília), a quebra do sistema de auto-incompatibilidade ou mesmo o surgimento de populações monomórficas (Barrett 1992; Dulberger 1992).

A posição dos órgãos sexuais em flores polinizadas por animais desempenham papel importante na dispersão do pólen aos estigmas co-específicos (Thompson *et al.* 2003). Especialmente para aquelas espécies heterostílicas que carecem de sistema de incompatibilidade heteromórfica, as diferenças morfológicas entre morfos irão influenciar fortemente os padrões de cruzamento entre indivíduos (Barrett *et al.* 2004). Ao visitar espécies distílicas, os polinizadores tendem a carregar pólen em diferentes partes do corpo, devido à hercogamia recíproca (Lloyd & Webb 1992a; Massinga *et al.* 2005) e assim realizar a polinização inter-morfos. Deste modo, seria esperado que em espécies distílicas com alta reciprocidade, um determinado visitante legítimo seja igualmente efetivo em ambos os morfos florais, em relação às taxas de formação de frutos.

A efetividade de um polinizador refere-se à sua contribuição na aptidão das plantas, tanto por componentes qualitativos como quantitativos (Herrera 1987; 1989; Moragues & Traveset 2005). Esta efetividade inclui o seu comportamento e freqüência de visitas, a carga de pólen transportada, a taxa de deposição de pólen no estigma de outra flor co-específica, o sucesso de crescimento do tubo polínico e por último o sucesso de fertilização dos óvulos no ovário (Gross 2005). Um dos vários componentes da efetividade de um polinizador é a análise do sucesso reprodutivo feminino, pelo efeito no sucesso de formação de frutos após uma única visita (Ivey *et al.* 2003). Esta medida direta de efetividade de polinização, além de permitir comparações entre populações de plantas ou espécies de polinizadores, implica que o polinizador não só removeu o pólen, como também o depositou no estigma e este pólen foi capaz de fertilizar o óvulo (Spears 1983). Dados de diferentes espécies de polinizadores são importantes principalmente na análise de possíveis relações de especialização, ou mesmo sobre o papel de cada visitante no sucesso de polinização da planta em questão (Stebbins 1970; Fumero-Cabán & Meléndez-Ackerman 2007).

Psychotria carthagenensis, em populações previamente estudadas em Campo Grande-MS, não apresenta evidências de limitação na polinização (polinização natural vs. polinização inter-mórfica), possui características morfológicas tipicamente distílicas, como alta reciprocidade entre os morfos e igual proporção de morfos nas populações, porém com quebra do sistema de autoincompatibilidade (Faria, 2011 – Capítulo 2). É uma espécie arbustiva de sub-bosque, medindo de 2-3 metros de altura, que ocorre distribuída da Costa Rica até a Argentina (Delprete *et al.* 2005). Tanto na região do Pantanal como em áreas de Cerrado é comum a ocorrência destas plantas em zonas de solos úmidos, nas proximidades de cursos e/ou corpos de água (Pott & Pott 1994; Felfili *et al.* 2001). No intuito de verificar se as espécies polinizadoras atuam de maneira similar em ambos os morfos de *P. carthagenensis*, este trabalho verificou o efeito das visitas mediadas pela abelha exótica *Apis mellifera* e pela abelha nativa *Augochloropsis* sp no sucesso reprodutivo feminino destas plantas.

Metodologia

O estudo foi realizado no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. As três populações estudadas de *P. carthagenensis* ocorrem em fragmentos de cerrado localizados em áreas protegidas imersas em uma matriz urbana, distantes entre si em média 12.45 km. Os fragmentos estudados são Parque Estadual do Prosa (PEP - 135ha, 20°27'00"S, 54°33'46"W); Reserva Biológica da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS - 35ha, 20°29'58"S, 54°36'50"W) e Reserva Natural da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Gado de Corte (EMBRAPA - 175ha, 20°25'41"S, 54°43'03"W). Em todas as áreas estudadas *P. carthagenensis* ocorre em solos úmidos. O clima na região é do tipo Savana Tropical (tipo Aw cf. Köppen, 1948), caracterizado por uma pronunciada estação seca (maio a setembro), e uma estação chuvosa (outubro a abril). A precipitação anual acumulada é de aproximadamente 1.532mm, e as temperaturas médias anuais estão entre 20-22°C (EMBRAPA-CNPGC, 1985). Na região, *P. carthagenensis* floresce entre outubro e dezembro (Faria, 2011 - Capítulo 1). Deste modo os experimentos foram conduzidos entre novembro e dezembro de 2009.

Para avaliar o sucesso reprodutivo feminino nas flores de ambos os morfos de *Psychotria carthagenensis* foi verificada a produção de frutos após uma visita das abelhas *Apis mellifera* e *Augochloropsis* sp., sendo que cada uma destas espécies foi considerada um tratamento. Especificamente, a abelha *Augochloropsis* sp pode se tratar de mais de uma espécie devido a dificuldade de identificação até o nível específico (C. Aoki *com. pess.*). As duas espécies foram eleitas para esse experimento pelo fato de terem sido os visitantes legítimos mais frequentes em observações prévias sobre visitação às mesmas populações estudadas (Faria, 2011 - Capítulo 1). A abertura das flores em *P. carthagenensis* inicia entre 0500h e 0600h, em ambos morfos. Então, a partir da abertura das flores, os lobos da corola estão totalmente separados e perpendicularmente posicionados em relação ao eixo floral, com as estruturas reprodutivas expostas. A senescência floral ocorre entre 1700h e 1800h do mesmo dia (Koch *et al.* 2010). Botões de *P. carthagenensis* foram ensacados em pré-antese e,

no período inicial da antese, quando as flores estavam abertas e receptivas, os sacos foram removidos, sendo posteriormente aguardada a visita do polinizador de interesse. Após a visita e partida do polinizador, a flor foi novamente ensacada para posterior verificação da produção de frutos. Para cada tratamento foram realizadas 30 repetições em cada morfo (brevistilo e longistilo) de cada uma das três populações. Porém somente na EMBRAPA o tratamento com *Augochloropsis* sp atingiu o número desejado de repetições (n=30) para os dois morfos de modo que para os outros dois locais (UFMS e PEP), os experimentos foram feitos somente com *A. mellifera*.

O sucesso de frutificação obtido para as duas espécies de polinizadores foi comparado com o sucesso obtido em flores tratadas com polinização cruzada manual (xenogamia, Faria 2011 - Capítulo 2). No tratamento de xenogamia foi feita a deposição manual de pólen (proveniente da flor de um indivíduo diferente e do morfo oposto) no estigma receptivo de flores virgens e emasculadas. Após a manipulação, as flores foram novamente ensacadas para posterior verificação na produção de frutos. Em cada população foram realizadas 20 repetições por morfo. A comparação entre a taxa de formação de frutos após visitas das abelhas, e aquela obtida a partir do tratamento de xenogamia foi realizada, partindo da premissa que a xenogamia representaria o limite máximo de polinização para essas flores (Sobrevilla & Arroyo 1982). Para tal comparação foi utilizado o teste G.

Resultados

Tanto *Apis mellifera* quanto *Augochloropsis* sp ao visitar as flores de *P. carthagenensis* introduzem a parte anterior do seu corpo na corola; no caso de *A. mellifera* a cabeça, e no caso de *Augochloropsis* sp desde a cabeça até a região do tórax.

A taxa de formação de frutos de *P. carthagenensis* após uma única visita de *Apis mellifera* nas populações estudadas variou entre 10% em flores brevistílicas na população da UFMS até 30% também em flores brevistílicas na população da EMBRAPA (Figura 1). Em relação ao morfo longistílico, os valores de frutificação após uma visita de *Apis mellifera* ficaram

entre 20% na EMBRAPA e UFMS e 33% em PEP (Figura 1 e 2). A taxa de formação de frutos após uma visita de *Augochloropsis* sp na EMBRAPA foi de 27% em flores brevistílicas e 30% em flores longistílicas (Figura 2 e 3). Quando comparado o sucesso de frutificação nas flores do tratamento de xenogamia e as flores visitadas por *Apis mellifera* não houve diferença significativa entre morfos para nenhuma das populações; o mesmo ocorrendo quando comparadas as flores do tratamento de xenogamia e as visitadas por *Augochloropsis* sp (Tabela 1). Para a população da EMBRAPA, quando comparados a taxa de formação de frutos entre uma visita de *Augochloropsis* sp e uma visita de *A. mellifera* também não houve diferença significativa ($G = 1.71$; $GI = 1$; $P = 0.191$).

Discussão

Tanto um polinizador exótico (*Apis mellifera* em todas as populações) quanto um nativo (*Augochloropsis* sp na EMBRAPA) foram efetivos em relação ao sucesso reprodutivo feminino nas populações de *P. carthagenensis*. Devido às diferenças morfológicas e comportamentais, que são responsáveis por diferenças na qualidade e quantidade de pólen depositado em estigmas de espécies vegetais nativas, poderia ser esperado que os polinizadores exóticos, de maneira geral, fossem menos eficientes que os nativos (Kenta *et al.* 2007; Madjidian *et al.* 2008). Ou mesmo que os polinizadores exóticos pudessem competir com os nativos e afetar negativamente a polinização das plantas nativas (Goulson 2003). Para responder a tais questões seriam necessários estudos mais detalhados, abordando outros componentes de eficiência de polinização e não só o sucesso de frutificação nas populações de *P. carthagenensis*, bem como analisar a dinâmica populacional das espécies de polinizadores envolvidas. Abelhas *A. mellifera* têm sido apontadas como importantes polinizadoras de algumas espécies nativas (Dick 2001; Nadia *et al.* 2007), embora outros estudos demonstrem que elas podem reduzir o sucesso reprodutivo das plantas que visitam (Gross & Mackay 1998; Carmo *et al.* 2004). *Apis mellifera* foi introduzida nas Américas cerca de 50 anos atrás, porém, o real impacto desta espécie exótica nas comunidades de abelhas nativas é de difícil

conclusão, uma vez que não há estudos prévios das interações entre abelhas e plantas nativas em período anterior a introdução desta abelha (Wilms *et al.* 1996).

Tomando como base a comparação com os resultados da taxa de formação de frutos no experimento de xenogamia, uma única visita das abelhas foi suficiente para cumprir a função feminina na polinização nas populações estudadas. Isso é indicativo de que provavelmente não ocorra limitação na polinização nessas populações de *P. carthagenensis*. Em *Ipomea trichocarpa*, que é polinizada por abelhas, também não houve diferença na formação de frutos entre os tratamentos de uma ou ilimitadas visitas de *Bombus* sp (Spears 1983). Outra espécie entomófila, *Heterotheca subaxillaris* (Asteraceae), obteve níveis de frutificação de até 90% dependendo da espécie de abelha, também com apenas uma visita (Olsen 1997). No caso da espécie distílica *Paulicoria padifolia* (Rubiaceae), em um experimento utilizando beija-flores empalhados para simular visitas, tanto uma como cinco inserções dos bicos resultaram em valores similares na produção de frutos, porém houve diferença no sucesso de frutificação entre os morfos florais (Ornelas *et al.* 2004). As diferenças entre morfos encontradas em *P. padifolia* foram atribuídas a esterilidade masculina em flores brevistilas, maior efetividade de transferência de pólen de flores brevistilas para longistilas e a maior aderência de pólen pela superfície estigmática das flores brevistilas (Ornelas *et al.* 2004).

Neste estudo foi reportado que *Apis mellifera* e *Algochlopsis* obtiveram efetividades similares na polinização de *P. carthagenensis*. Estes dados poderiam sugerir que ambas as espécies de polinizadores contribuem para a manutenção do polimorfismo floral desta espécie. No entanto, as populações estudadas apresentam quebra no sistema de auto-incompatibilidade (Faria 2011 – Capítulo 2), ou seja, é possível que a origem dos grãos de pólen depositados nos estigmas por *Apis mellifera* e *Algochlopsis* sp seja uma combinação de pólen autógamo, intramórfico e inter-mórfico. A possibilidade de as flores serem fertilizadas por esses diferentes tipos de pólen torna a formação de frutos menos restritiva. Porém, o esperado para espécies heterostílicas em situações de quebra do sistema de auto-incompatibilidade é o desvio do sistema típico de heterostilia (Barrett & Husband 1990; Richards & Barrett 1992; Weller 1992).

Prova disso é o que já tenham sido registradas populações monomórficas, anisopléticas e homostílicas de *P.carthagenensis* (Consolaro *et al* 2011; Demétrio & Machado 2005; Pereira 2007). Contudo, a autocompatibilidade poderia ser vantajosa, em pequenas populações que estão sob perturbações constantes, como forma de assegurar o sucesso reprodutivo (Barrett & Shore 1987; Schoen *et al.* 1997). As três populações de *P. carthagenensis* deste estudo se encontram em fragmentos de mata isolados e sob forte influência antrópica, de modo que poderia ser vantajoso manter um sistema de autocompatibilidade.

De acordo com os resultados deste estudo, sob condições naturais, uma única visita de *Apis mellifera* e *Augochloropsis* sp a flores de *P. carthagenensis*, independente de seu morfo floral é suficiente para assegurar o sucesso reprodutivo feminino. A garantia da reprodução via produção de sementes pode ser importante para essas plantas, devido às restrições a que estão impostas, como sua localização em fragmentos de mata pequenos e sob forte influência antrópica.

Agradecimentos

À V.Pott pela identificação das plantas; P.Menezes e V.A.Laura pelo apoio logístico nas reservas PEP and EMBRAPA respectivamente; L.Navarro pelos comentários prévios à redação do manuscrito. FUNDECT/CAPES pela bolsa de doutorado a R.R.Faria (41/100.271/2006); CAPES pela bolsa no Programa de Estágio de Doutorando no Exterior concedida a R.R. Faria (1964/10-0); FUNDECT pelo apoio financeiro (23/200.288/2008).

Referências

Arroyo, J., Barrett, S.C.H., Hidalgo, R. & Cole, W.W. (2002) Evolutionary maintenance of stigma-height dimorphism in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany*, **89**, 1242–1249.

- Barrett, S.C.H. (1992) Heterostylous genetic polymorphisms: Model systems for evolutionary analysis. In: *Evolution and Function of Heterostyly* (Ed. S.C.H. Barrett), pp. 1-29, Springer-Verlag, Berlin.
- Barrett, S.C.H. (2002) The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 274–284.
- Barrett, S.C.H. & Husband, B.C. (1990) Variation in outcrossing rates in *Eichhornia paniculata*: the role of demographic and reproductive factors. *Plant Species Biology*, **5**, 41–55.
- 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. & Shore, J.S. (1987) Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* complex (Turneraceae). *Evolution*, **41**, 340–354.
- Barrett, S.C.H., Harder, L.D. & Cole, W.W. (2004) Correlated evolution of floral morphology and mating type frequencies in a sexually polymorphic plant. *Evolution*, **58**, 964–975.
- Carmo, R.M., Franceschinelli, E.V. & Silveira, F.A. (2004) Introduced honeybees (*Apis mellifera*) reduce pollination success without affecting the floral resource taken by native pollinators. *Biotropica*, **36**, 371-376.
- Consolaro, H.N., Silva, S.S. & Oliveira, P.E. (2011) Breakdown of distyly and pin-monomorphism in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Plant Species Biology*, **26**, 24–32.
- Darwin, C. (1877) *The different forms of flowers on plants of the same species*. John Murray, London.
- Delprete, P.G., Smith, L.B. & Klein, R.M. (2005) Rubiaceae. In: A. Reis (Ed). *Flora Ilustrada Catarinense. I Parte – As Plantas/ Monografia*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí: 542-549.
- Demétrio, K.M. & Machado, I.C. (2005) Biologia floral, polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria carthagenensis*. *Resumos do 56º Congresso Nacional de Botânica*. Sociedade Botânica do Brasil. Curitiba.

- Dick, C.W. (2001) Genetic rescue of a remnant tropical tree by an alien pollinator. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences*, **268**, 2391–2397.
- Dulberger, R. (1992) Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In: S.C.H. Barrett (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. Springer, Berlin Heidelberg New York: 41-84.
- EMBRAPA - CNPQC. (1985) *Boletim Agro meteorológico*. Campo Grande.
- Felfili, J. M., Mendonça, R.C., Nóbraga, M. G.G., Fagg, C.W., Sevilha, A.C. & Silva, MA. (2001) Flora fanerogâmica das matas ciliares do Brasil central. 195-263p. In: Ribeiro J.F., Fonseca, C.E.L., Sousa-Silva, J.C (Ed). *Cerrado: caracterização recuperação de matas ciliares*. EMBRAPA, Planaltina-DF. 899p.
- Fumero-Cabán, J.J. & Meléndez-Ackerman, E.J. (2007) Relative pollination effectiveness of floral visitors of *Pitcairnia angustifolia* (BROMELIACEAE). *American Journal of Botany*, **94**, 419–424. 2007.
- Ganders, F.R. (1979) The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany*, **17**, 607–635.
- Goulson, D. (2003) Effects of introduced bees on native ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **34**, 1–26.
- Gross, P. (2005) Pollination effectiveness. In: Dafni, A., Kevan, P.G., Husband, B.C.(Eds.), *Practical Pollination Biology*. Enviroquest Ltd 590 pp.
- Gross, C.L. & Mackay, D. (1998) Honeybees reduce fitness in the pioneer shrub *Melastoma affine* (Melastomataceae). *Biological Conservation*, **86**, 169-178.
- Herrera, C.M. (1987) Components of pollination “quality”: comparative analysis of a diverse insects assemblage. *Oikos*, **50**, 79–90.
- Herrera, C.M. (1989) Pollinator abundance, morphology, and visitation rate: analysis of the “quantity” component in a plant–pollinator system. *Oecologia*, **80**, 241–248.
- Ivey, C.T., Martínez, P. & Wyatt, R. (2003) Variation in pollinator effectiveness in swamp milkweed, *Asclepias incarnata* (Apocynaceae). *American Journal of Botany*, **90**, 214–225.

- Kenta, T., Inari, N., Nagamitsu, T., Goka, K. & Hiura, T. (2007) Commercialized European bumblebee can cause pollination disturbance: an experiment on seven native plant species in Japan. *Biological Conservation*, **134**, 298–309.
- Koch, A.K., Silva, P.C. & Silva, C.A. (2010) Biologia Reprodutiva de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae), espécie distílica de fragmento floresta de mata ciliar, Centro Oeste do Brasil. *Rodriguesia*, **61**, 551–558.
- Köppen, W. (1948) *Climatología*. Editora Fondo de Cultura Económica, Mexico.
- Lloyd D.G. & Webb C.J. (1992a) The evolution of heterostyly. In: S.C.H. Barrett (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. Springer, Berlin Heidelberg New York: 151-178.
- Lloyd D.G. & Webb C.J. (1992b) The selection of heterostyly. In: S.C.H. Barrett (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. Springer, Berlin Heidelberg New York: 179-207.
- Madjidian, J.A., Morales, C.L. & Smith, H.G. (2008) Displacement of a native by an alien bumblebee: lower pollinator efficiency overcome by overwhelmingly higher visitation frequency. *Oecologia*, **156**, 835-845.
- Massinga, P.H., Johnson, S.D. & Harder, L.D. (2005) Heteromorphic incompatibility and efficiency of pollination in two distylous *Pentanisia* species (Rubiaceae). *Annals of Botany*, **95**, 389–399.
- Moragues, E. & Traveset, A. (2005) Effect of *Carpobrotus* spp. on the pollination success of native plant species of the Balearic Islands. *Biological Conservation*, **122**, 611–619.
- Nadia, T.L., Machado, I.C & Lopes, A.V. (2007) Fenologia reprodutiva e sistema de polinização de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae): atuação de *Apis mellifera* e de visitantes florais autóctones como polinizadores. *Acta Botanica Brasilica*, **21**, 835-845.
- Olsen, K.M. (1997) Pollination effectiveness and pollinator importance in a population of *Heterotheca subaxillaris* (Asteraceae). *Oecologia*, **109**, 114–121.
- Ornelas, J. F, Jiménez, L., González, C. and Hernández, A. (2004) Reproductive ecology of distylous *Paulicorea padifolia* (RUBIACEAE) in a tropical montane cloud forest. I. Hummingbirds' effectiveness as pollen vectors. *American Journal of Botany*, **91**, 1052–1060.

- Pereira, Z.V. (2007) *Rubiaceae Juss. do Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul: florística, sistema reprodutivo, distribuição espacial e relações alométricas de espécies distílicas*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Pérez-Barrales, R., Arroyo, J. & Armbruster, W.S. (2007) Differences in pollinator faunas may generate geographic differences in floral morphology an integration in *Narcissus papyraceus* (Amarillidaceae). *Oikos*, **116**, 1904–1918.
- Pott, A. & Pott, V.J. (1994) *Plantas do Pantanal*. 1° ed. Mato Grosso do Sul: Embrapa, Corumbá. 320p.
- Richards, J.H. & Barrett, S.C.H. (1992) The development of heterostyly. In: S.C.H. Barrett (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. Springer, Berlin Heidelberg New York: 85-127.
- Schoen, D.J., Johnston, M.O., L’Heureux, A.M. & Marsolais, J.V. (1997) Evolutionary history of the mating system in *Amsinckia* (Boraginaceae). *Evolution*, **51**, 1090–1099.
- Sobrevilla, C. & Arroyo, M.T.K. (1982) Breeding systems in a montane tropical cloud forest in Venezuela. *Plant Systematics and Evolution*. **140**, 19-37.
- Spears, E.E. (1983) A direct measure of pollinator effectiveness. *Oecologia*, **57**, 196–199.
- Stebbins, G.L. (1970) Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I. Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **1**, 307–326.
- Thompson, J.D, Barrett, S.C.H & Baker, A.M. (2003) Frequency-dependent variation in reproductive success in *Narcissus*: implications for the maintenance of stigma-height dimorphism. *Proceedings of Royal Society of London. Biological Sciences*, **270**, 949–953.
- Weller, S.G. (1992) Evolutionary modifications of tristylous breeding systems. In: S.C.H. Barrett (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. Springer, Berlin Heidelberg New York: 247–272.
- Wilms,W., Imperatriz-Fonseca, V.L. & Engels, W. (1996) Resource partitioning between highly eusocial bees and possible impact of the introduced Africanized honey bee on native stingless bees in the Brazilian Atlantic rain forest. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, **31**, 137–151.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Resultados do teste G para comparações de sucesso de frutificação entre *Apis mellifera* e Xenogamia e também entre *Augochloropsis* sp e Xenogamia nas três populações estudadas de *Psychotria carthagenensis*, em flores longistilas (L) e brevistilas (B), Campo Grande-MS.

População	Morfo	<i>Apis mellifera</i> vs.Xenogamia			<i>Augochloropsis</i> vs.Xenogamia		
		G-test	Df	P	G-test	Df	P
UFMS	L	0.207	1	0.65	-	-	-
	B	0.975	1	0.32	-	-	-
PEP	L	1.088	1	0.30	-	-	-
	B	0.078	1	0.78	-	-	-
EMBRAPA	L	0.173	1	0.68	0.150	1	0.70
	B	1.548	1	0.21	0.988	1	0.32

Figura 1

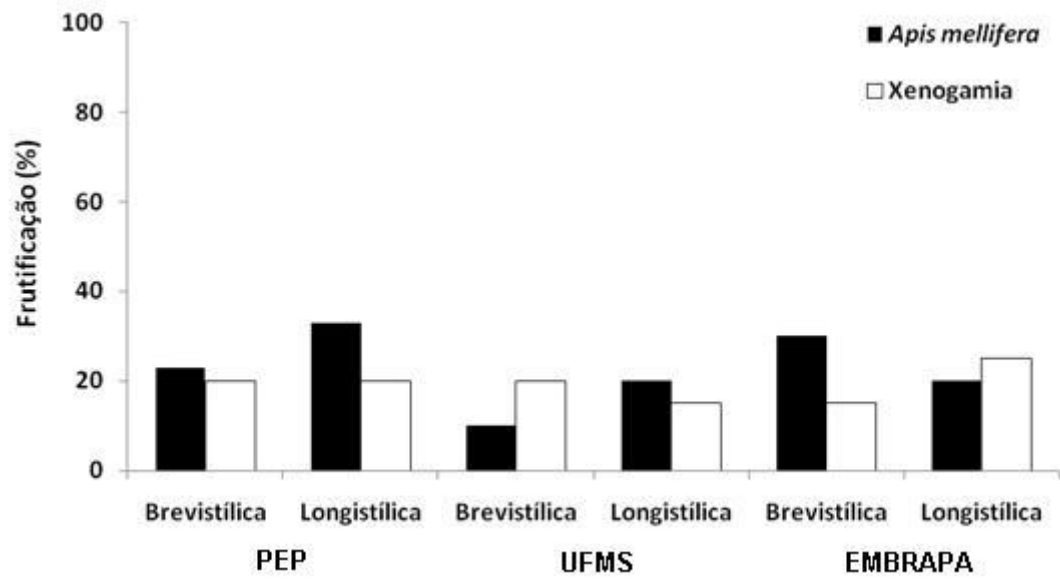


Figura 2

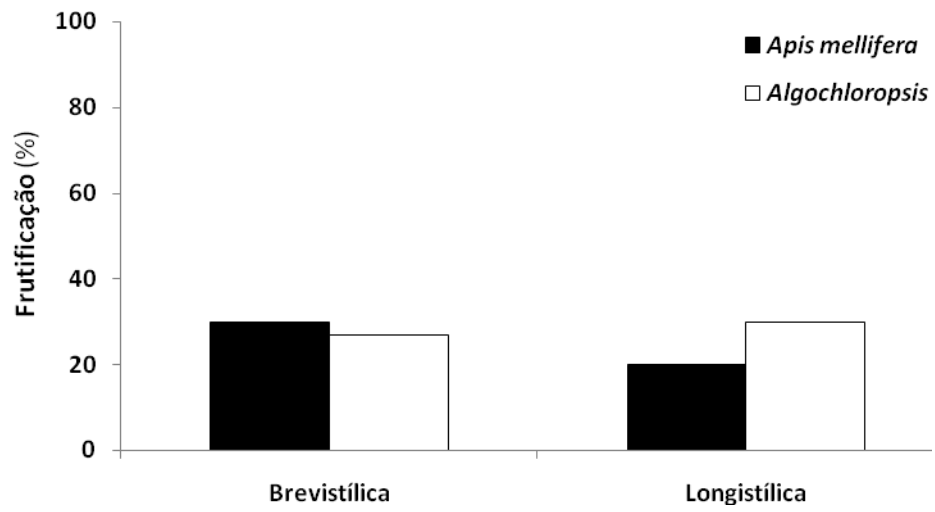
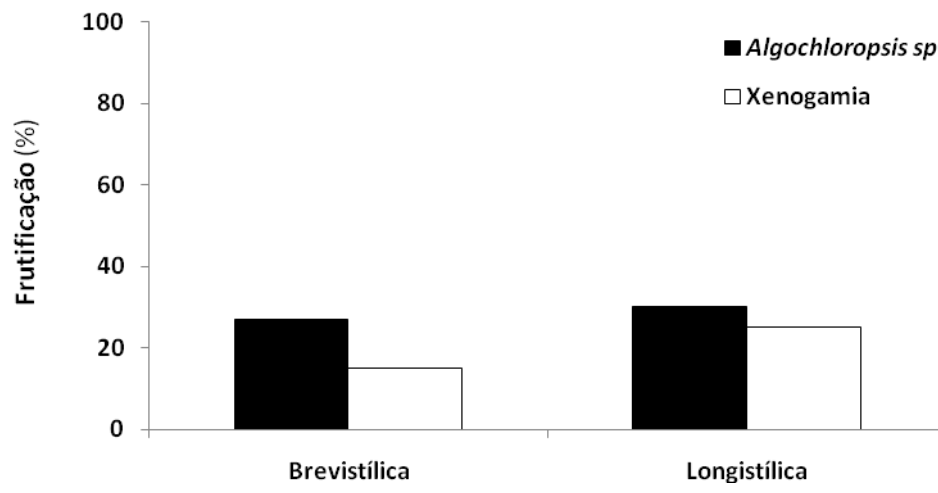


Figura 3



LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Sucesso de frutificação (em %) nos tratamentos de uma visita por *Apis mellifera* e Xenogamia nas três populações estudadas de *P. carthagenensis*, Campo Grande-MS.

Figura 2. Sucesso de frutificação (em %) nos tratamentos de uma visita por *Augochloropsis* sp. e *Apis mellifera* na população de *P. carthagenensis* em EMBRAPA, Campo Grande-MS.

Figura 3. Sucesso de frutificação (em %) nos tratamentos de uma visita por *Augochloropsis* sp. e Xenogamia na população de *P. carthagenensis* em EMBRAPA, Campo Grande-MS.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As populações de estudadas de *Psychotria carthagenensis*, apresentam semelhanças entre morfos quanto aos visitantes e à exibição floral, que permitem fluxo de pólen não-associativo, fator importante para a manutenção do sistema distílico. Além disso, oferecem néctar com concentração e volume semelhantes e possuem os mesmos visitantes florais, que visitam suas flores na mesma frequência. Dados como os apresentados no presente estudo são importantes para a compreensão da manutenção deste polimorfismo (Arroyo *et al.* 2002; Thompson *et al.* 2003; Barrett *et al.* 2004; Pérez-Barrales *et al.* 2007). Apesar de ter sido encontrado nas populações de *P. carthagenensis*, indícios de fluxo de pólen não-associativo, os resultados devem ser vistos com cautela, pois o fluxo de pólen em espécies heterostílicas deve ser avaliado através de métodos experimentais, que considerem principalmente a taxa deposição de pólen nos estigmas (*ver* Lau & Bosque, 2003; García-Robledo, 2008), o que não foi feito no presente estudo.

As populações estudadas de *P. carthagenensis* são isopléticas, havendo alto grau de reciprocidade entre morfos em relação ao posicionamento das estruturas reprodutivas, compatibilidade entre morfos e autogamia. Estas características em conjunto não se assemelham a nenhum dos padrões encontrados anteriormente para populações desta mesma espécie (*ver* Demétrio & Machado 2005; Pereira 2007; Koch *et al.* 2010; Consolaro *et al.* 2011). Por possuírem características tipicamente distílicas, porém com quebra do sistema de incompatibilidade heteromórfico, os resultados encontrados demonstram que, nas populações estudadas, a distília não está ligada ao sistema de incompatibilidade heteromórfico. Populações de *P. carthagenensis* reportadas em outros estudos, apresentaram diferenças nas características relacionadas à distília, principalmente em relação à razão entre morfos (homostília – Demétrio & Machado, 2005; anisopletia – Pereira, 2007; população monomórfica – Consolaro *et al.*, 2011; isopletia – Koch *et al.*, 2010) e ao sistema de incompatibilidade (auto-incompatível – Pereira, 2007 e Koch *et al.*, 2010; auto-compatível – Demétrio & Machado, 2005 e Consolaro *et al.*, 2011). Dentro de um mesmo gênero, ou mesmo de uma espécie é

conhecida a existência de variações no sistema de compatibilidade e também na razão de morfos entre populações. Variações nos padrões morfológicos e de incompatibilidade pode ser encontrados entre espécies congêneres e mesmo entre populações (Li & Johnston 2001; Perez-Barrales *et al.*, 2006; Castro *et al.* 2007; Sakai & Wright 2008; Ferrero *et al.*, 2011 a,b). Além da descrição do sistema reprodutivo de mais populações ao longo da distribuição geográfica de *P. carthagenensis*, também se faz importante conhecer as causas e conseqüências que levam aos diferentes modos de reprodução encontrados nestas populações.

As abelhas *Apis mellifera* e *Augochloropsis* sp foram os visitantes florais mais freqüentes nas populações de *P. carthagenensis*. Foi constatado experimentalmente, que independente do morfo floral, uma única visita destas abelhas é suficiente para assegurar o sucesso reprodutivo feminino das plantas da espécie estudada. O papel de abelhas exóticas, como a *Apis mellifera*, sobre a reprodução de plantas nativas ainda é discutível (ver Goulson 2003) tanto pela falta de dados, quanto pela dificuldade de integração de dados da diversidade existente nas interações planta-animal no espaço e no tempo (Wilms *et al.* 1996). Alguns estudos apontam efeitos positivos (e.g. Dick 2001; Nadia *et al.* 2007), e outros negativos (e.g. Gross & Mackay 1998; Carmo *et al.* 2004). No presente estudo foram obtidos os mesmos resultados para ambos os polinizadores analisados (*Apis mellifera* e espécie de abelha nativa), o que pode ser indicativo de que ambos são importantes na polinização de *P. carthagenensis*. , Assim como em outras espécies distílicas (Ramos & Santos 2006; Virilho *et al.* 2007; Machado & Sazima 2008), os polinizadores das populações de *P. carthagenensis* estudadas não apresentaram preferência por um morfo em particular, tendo sido *A. mellifera* o principal polinizador, devido a sua maior freqüência de visitas.

A generalização quanto ao uso dos visitantes florais aliada à sua exibição floral sincrônica; a quebra do sistema de auto-incompatibilidade, que pode assegurar a reprodução da espécie na ausência de seus polinizadores; e ainda seus visitantes florais mais freqüentes (*Apis mellifera* e *Augochloropsis* sp) que, independente do morfo floral, apresentam alta

efetividade de polinização, são fatores que sugerem que, apesar de *P. carthagenensis* ocorrer em populações localizadas em fragmentos isolados e sob influência antrópica, sustenta interações que beneficiam sua reprodução.. Relacionar fatores ambientais e evolutivos com o sistema reprodutivo em populações ao longo de toda a distribuição de *P. carthagenensis* são aspectos importantes para elucidar o papel de cada estratégia reprodutiva apresentada, sob o ponto de vista da distília como um mecanismo que promove a polinização legítima e reduz o desperdício de pólen.

REFERÊNCIAS

- Arroyo, J., Barrett, S.C.H., Hidalgo, R., Cole, W.W. 2002. Evolutionary maintenance of stigma-height dimorphism in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 89: 1242–1249.
- Barrett, S.C.H., Harder, L.D., Cole, W.W. 2004. Correlated evolution of floral morphology and mating type frequencies in a sexually polymorphic plant. *Evolution* 58: 964–975.
- Carmo, R.M., Franceschinelli, E.V., Silveira, F.A. 2004. Introduced honeybees (*Apis mellifera*) reduce pollination success without affecting the floral resource taken by native pollinators. *Biotropica* 36: 371-376.
- Castro, S., Loureiro, J., Santos, C., Ater, M., Ayensa, G., Navarro, L. 2007. Distribution of flower morphs, ploidy level and sexual reproduction of invasive weed *Oxalis pes-caprae* in the western area of the Mediterranean Region. *Annals of Botany* 99: 507-517.
- Consolaro, H.N., Silva, S.S., Oliveira, P.E. 2011. Breakdown of distyly and pin-monomorphism in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Plant Species Biology* 26: 24–32.
- Demétrio, K.M., Machado, I.C. 2005. Biologia floral, polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria carthagenensis*. Resumos do 56° Congresso Nacional de Botânica. Sociedade Botânica do Brasil. Curitiba.
- Dick, C.W. 2001 Genetic rescue of a remnant tropical tree by an alien pollinator. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences* 268: 2391–2397.

- Koch, A.K., Silva, P.C., Silva, C.A. 2010. Biologia Reprodutiva de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae), espécie distílica de fragmento floresta de mata ciliar, Centro Oeste do Brasil. Rodriguesia 61: 551–558.
- Ferrero, V., Castro, S., Sánchez J.M., Navarro, L. 2011a. Stigma-anther reciprocity, pollinators, and pollen transfer efficiency in populations of heterostylous species of *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). Plant Systematics and Evolution 291: 267–276.
- Ferrero, V., Chapela, I., Arroyo, J., Navarro, L. 2011b. Reciprocal style polymorphisms are not so easily categorized: the case of heterostyly in *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). Plant Biology 13: 7–18.
- García–Robledo, C. 2008. Asymmetry in pollen flow promotes gender specialization in morphs of the distylous neotropical herb *Arcytophyllum lavarum* (Rubiaceae). Evolutionary ecology 22: 743 - 755.
- Goulson, D. 2003. Effects of introduced bees on native ecosystems. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 34: 1–26.
- Gross, C.L., Mackay, D. 1998. Honeybees reduce fitness in the pioneer shrub *Melastoma affine* (Melastomataceae). Biological Conservation 86: 169-178.
- Lau, P., Bosque, C. 2003. Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae): an experimental test of the Disassortative Pollen Flow Hypothesis. Oecologia 135: 593–600.
- 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.
- Machado, I.C., Sazima, M. 2008. Pollination and breeding system of *Melochia tomentosa* L. (Malvaceae), a keystone floral resource in the Brazilian Caatinga. Flora 203: 484–490.
- Nadia, T.L., Machado, I.C., Lopes, A.V. 2007. Fenologia reprodutiva e sistema de polinização de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae): atuação de *Apis mellifera* e de visitantes florais autóctones como polinizadores. Acta Botanica Brasilica 21: 835-845.

- Pereira, Z.V. 2007. Rubiaceae Juss. do Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul: florística, sistema reprodutivo, distribuição espacial e relações alométricas de espécies distílicas. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Pérez-Barrales, R., Vargas, P., Arroyo, J. 2006. New evidence for the Darwinian hypothesis of heterostyly: breeding systems and pollinators in *Narcissus* sect. *Apodanthi*. New Phytologist 171: 553–567.
- Pérez-Barrales, R., Arroyo, J., Armbruster, W.S. 2007. Differences in pollinator faunas may generate geographic differences in floral morphology integration in *Narcissus papyraceus* (Amarillidaceae). Oikos 116: 1904–1918.
- Ramos, F.N., Santos, F.A.M. 2006. Floral visitors and pollination of *Psychotria tenuinervis* (Rubiaceae): Distance from the anthropogenic and natural edges of an Atlantic Forest Fragment. Biotropica 38: 383–389.
- Sakai, S., Wright, J. 2008. Reproductive ecology of 21 coexisting *Psychotria* species (Rubiaceae): when is heterostyly lost? Biological Journal of the Linnean Society 93: 125–134.
- Thompson, J.D., Barrett, S.C.H., Baker, A.M. 2003. Frequency-dependent variation in reproductive success in *Narcissus*: implications for the maintenance of stigma-height dimorphism. Proceedings of Royal Society of London. Biological Sciences 270: 949–953.
- Virilho, C.B., Ramos, F.N., Castro, C.C., Semir, J. 2007. Floral biology and breeding system of *Psychotria tenuinervis* Muell. Arg. (Rubiaceae) in the Atlantic rain forest, SE Brazil. Acta Botanica Brasilica 21: 879-884.
- Wilms, W., Imperatriz-Fonseca, V.L., Engels, W. 1996. Resource partitioning between highly eusocial bees and possible impact of the introduced Africanized honey bee on native stingless bees in the Brazilian Atlantic rain forest. Studies on Neotropical Fauna and Environment 31: 137–151.