

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ECOLOGIA DA POLINIZAÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Clusia hilariana*
Schltdl. (Clusiaceae), UMA ESPÉCIE-CHAVE DE VEGETAÇÃO DE RESTINGA

RODRIGO LEMES MARTINS

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
AGOSTO DE 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RODRIGO LEMES MARTINS

ECOLOGIA DA POLINIZAÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Clusia hilariana*
Schltdl. (Clusiaceae), UMA ESPÉCIE-CHAVE DE VEGETAÇÃO DE RESTINGA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (ecologia)

ORIENTADOR: Prof. Ph.D. FÁBIO RUBIO SCARANO

CO-ORIENTADORES: Prof. Ph.D. ROGÉRIO MARGIS

Prof^a. Dr^a. TÂNIA WENDT

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
AGOSTO DE 2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA – PPGE

CX POSTAL 68.020 – ILHA DO FUNDÃO
CEP: 21941-590 – RIO DE JANEIRO – RJ – BRASIL
TEL./FAX: (21) 290-3308 TEL.:(21)562-6320

ECOLOGIA DA POLINIZAÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Clusia hilariana*
Schltdl. (Clusiaceae), UMA ESPÉCIE-CHAVE DE VEGETAÇÃO DE RESTINGA

RODRIGO LEMES MARTINS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas (ecologia)

defendida em 28 de setembro de 2007

APROVADA POR:

Prof. Fábio Rubio Scarano, Ph.D.
UFRJ

Prof. Rogério Gribel, Ph.D.
INPA

Prof^a. Maria Cristina Gaglianone, Dr^a.
UENF

Prof. Leandro Freitas, Dr.
Jardim Botânico do Rio de Janeiro

Prof. Fabiano Salgueiro, Dr.
UFRRJ

MARTINS, RODRIGO LEMES

Ecologia da polinização e variabilidade genética de *Clusia hilariana* Schlttdl. (Clusiaceae), uma espécie-chave de vegetação de restinga [Rio de Janeiro] 2007 xviii, 122 p., 29,7 cm (Instituto de Biologia/UFRJ, Dr.,

Ecologia, 2007)

Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro, PPGE

1. *Clusia hilariana*; 2. Biologia reprodutiva; 3. polinização.

I. IB/UFRJ II. Título (série)

Ao amor dos meus pais

Agradecimentos

Ao Prof. Fábio Rubio Scarano, por ter superado o meu modelo de profissional, educador e cientista, consolidando em minha mente a vontade de seguir trilhando o caminho da educação do conhecimento científico. Sinto-me privilegiado de ter podido trabalhar sob a sua orientação e espero que esta cooperação seja tão duradoura quanto a esperança tricolor.

A Prof^a. Tânia Wendt pelo modelo de caráter e sobriedade na condução do laboratório e na postura profissional.

Ao Prof. Rogério Margis pela inestimável cooperação para a realização da parte relacionada à genética e pelo gênio forte, que sempre me desafiava a ir a diante nos meus conhecimentos e minhas convicções.

Ao Prof. Paulo Eugênio que colaborou com a parte de microscopia do trabalho e que continua me orientando e me ajudando com seus conselhos e cutucões paternais.

Ao colega André T. C. Dias que participou da produção dos dados relacionados à genética, com sua inquebrantável paz monástica e sistemática aplicação no desenvolvimento do conhecimento científico.

Ao Prof. Francisco de Assis Esteves pelo carinho de amigo e pela cooperação em toda atividade desenvolvida no campo, por meio da infra-estrutura do NUPEM – Núcleo de Pesquisas Ecológicas de Macaé.

Aos funcionários do NUPEM (Alex Prast, Nena, Sr. Paulo, João Marcelo, Amarildo, Lia, Sr. PP, Ana Paula, D. Inêz, Ana Lúcia, Sr. Carlos), pelo amizade e carinho durante minhas longas estadias em Macaé.

Aos funcionários do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (Albrunes, Padeiro, Charles, Baiano e Russo) sempre com astral superelevado foram meus verdadeiros companheiros de campo.

Aos meus estimados amigos/irmãos (Diôgo, Leonardo, Lívia, Christina, Fabiana, Adriana *in memoriam*, Aldrin, Rogério Gribel, Glória, Gustavo, Leonora, Flávia, Sr. Luiz e Danielle) e as equipes dos Laboratórios de Taxonomia vegetal (Prof^a. Rosana, Daniel, Silvana, Leandro, Ana Paula, Leonardo e Renata), Biologia molecular (Lina, Mariana, Fernanda, Fátima, Luiz, Bel, Elisson, Fabiano e Ana) e Ecologia Vegetal (Izar Aximoff, Joyce, Luiz Felipe, Tadeu, Rosália, Bruno, Pedro e Bel), pelos aprendizados ao longo dos últimos anos.

Ao PPGE, nas figuras de seus coordenadores, Reinaldo Bozelli e Erica Caramaschi, e de suas secretárias, Márcia Renault e Sueli Lima Teixeira, por toda a ajuda e presteza.

Ao Prof. Giancarlo Pasquali, do laboratório de Biologia Molecular Vegetal, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por ter concedido gentilmente o uso do seqüenciador automático.

Ào CNPq, pela concessão da bolsa.

Aos membros da pré-banca e da banca, por todas e quaisquer contribuições feitas a esse trabalho.

Ao suporte financeiro do Projeto Brasileiro de Estudos Ecológicos de Longa Duração (PELD –, site 5, CNPq), ao Centro de Pesquisas (Cenpes) da Petrobrás - Petróleo Brasileiro S.A. e à Fundação Botânica Margaret Mee.

A toda a atenção e à autorização do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA) para que o estudo pudesse ser realizado no Parque Nacional de Restinga de Jurubatiba.

Resumo

Clusia hilariana Schltdl. (Clusiaceae) é uma árvore dióica, com metabolismo CAM, que domina extensas faixas arenosas do litoral norte do sudeste brasileiro. Estas restingas são potencialmente importantes ao seqüestro de carbono e *C. hilariana* tem sido descrita como espécie-chave à origem e manutenção da biodiversidade local e ciclagem de nutrientes local. Dados prévios de biologia reprodutiva indicam que a espécie (1) apresenta resina como recurso floral; (2) não apresenta agamospermia; (3) é visitada basicamente por pequenas abelhas Augochlorini que promovem fluxo gênico restrito; (4) apresenta baixa produção de frutos e (5) dificuldades no estabelecimento de plântulas, sugerindo que as extensas populações na região sejam originadas e/ou mantidas via reprodução clonal. Nesse contexto, o trabalho analisou a importância da reprodução sexuada na colonização do ambiente de restinga em termos atuais e históricos, avaliando ecologia da polinização e genética de populações. Quatro capítulos trataram das seguintes questões: (1) se existia estruturação genética em 15 escalas espaciais diferentes, entre 5 e 75 metros (para se avaliar a importância da reprodução clonal na colonização das áreas de restinga); (2) se ocorria automimetismo floral e polinização por engano; (3) se havia indicativos da ocorrência de uma baixa taxa de polinização, considerando diferentes etapas entre a polinização e a produção de frutos, ou se a baixa produção de frutos ocorre em função da produção luxuriosa de flores femininas, e (4) se a diversidade genética inter e intra subpopulações está distribuída em conformidade com os dados de fluxo promovido pelo automimetismo e polinização por engano. Os resultados sugeriram que: (1) a reprodução clonal tem importância reduzida na colonização da área de estudo; (2) *C. hilariana* apresenta padrões característicos de automimetismo floral; (3) a proximidade de plantas masculinas floridas teve influência positiva na produção de frutos nas plantas fêmeas, gerando um padrão estocástico diferente do que se esperaria para definir um baixo sucesso de polinização, e (4) a baixa heterozigosidade e a variação genética entre populações indicaram que a população está geneticamente estruturada. No entanto, a baixa diferenciação genética pode estar relacionada com a colonização recente dos ambientes de restinga e da ocorrência de efeito gargalo de garrafa.

Abstract

Clusia hilariana Schlttdl. (Clusiaceae) is a dioecious tree with crassulacean acid metabolism that dominates vast areas of the northern section of the coastal vegetation of southeast Brazil, locally called *restinga*. This vegetation-type is potentially important to carbon sequestration and *C. hilariana* has been described as a keystone species largely related to origin and maintenance of local biodiversity and strongly responsible for local patterns of nutrient cycling. However, previous data on reproductive biology suggest that this species (1) has resin as a floral resource; (2) does not have agamospermy; (3) is visited by small bees that promote a restrict gene flux; (4) has a low fruit production, and (5) has difficulties related to seedling establishment, which suggests that local populations might have reached high abundance via clonal reproduction. This thesis aimed to test some of these notions, while analysing the importance of sexual reproduction of *C. hilariana* in past and current *restinga* colonization by assessing pollination ecology and genetics. Four chapters have dealt with the following questions: (1) Are populations genetically structured at 15 different spatial scales, between 5 and 75 meters (which allowed assessing the relative importance of clonal reproduction for *restinga* colonization by the species)? (2) Does the species display floral automimetism and deception pollination? (3) Is low fruit production a consequence of pollination failure or of luxurious female flower production? (4) Is genetic diversity (both inter- and intra-subpopulations) in harmony with a reproductive system characterized by automimetism and deception pollination? Results suggested that: (1) clonal reproduction is of reduced relevance for the species colonization and population expansion at the study area; (2) *C. hilariana* displays automimetism and deception pollination; (3) the proximity of male plants positively influenced fruit production in female plants, creating an stochastic pattern of reproductive success, differently from the expected if pollination failure took place; and (4) the low heterozigosity and the genetic divergence among populations indicate that the population are genetically structured. However the low divergence within population is in harmony with the hypothesis of recent colonization of *restinga* and the occurrence of bottleneck effect.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE:	1
Introdução geral	2
0.1. Biologia floral do gênero <i>Clusia</i>	2
0.2. O caso da <i>Clusia hilariana</i>	6
0.3. Resultados já publicados	11
0.4. Área de estudo	14
0.5. Estrutura e organização da tese	19
SEGUNDA PARTE:	21
Capítulo 1 - Importância relativa da reprodução vegetativa de <i>Clusia hilariana</i> Schltld. (Clusiaceae) para a colonização dos ambientes de restinga	22
1.1. Introdução	22
1.2. Material e Métodos	24
1.3. Resultados	32
1.4. Discussão	40
Capítulo 2 - Automimetismo floral em <i>Clusia hilariana</i> Schltld. (Clusiaceae)	44
2.1. Introdução	44
2.2. Material e Métodos	45
2.3. Resultados	50
2.4. Discussão	60
Capítulo 3 - Produção de flores e polinização por engano em <i>Clusia hilariana</i> Schltld. (Clusiaceae)	65
3.1. Introdução	65
3.2. Material e Métodos	67
1.3. Resultados	71
2.4. Discussão	80

Capítulo 4 - A variabilidade genética de <i>Clusia hilariana</i> Schltld. (Clusiaceae).....	83
4.1. Introdução	83
4.2. Material e métodos	84
4.3. Resultados	87
4.4. Discussão.....	93
 TERCEIRA PARTE:.....	 96
Discussão geral.....	97
Conclusão.....	102
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 104

Índice de figuras

- Figura 0.1. *Clusia hilariana* Schltldl. no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro. A) Moita de vegetação da Formação Arbustiva Aberta de *Clusia* apresentando um indivíduo masculino de *C. hilariana* na posição central da moita. B) Flores masculinas de *C. hilariana* em inflorescência. C) Flor feminina de *C. hilariana*. D e E) Variação de tons de rosa nas pétalas de flores masculinas de *C. hilariana*. 7
- Figura 0.2. Fruto deiscente de *Clusia hilariana* Schltldl. expondo as sementes envoltas no arilo laranja conspícuo. Foto de Fábio Antônio Ribeiro Matos. 8
- Figura 0.3. Região Norte Fluminense entre as coordenadas 21°21' - 22°58' S e 41°10' - 41°44' W. A). Região costeira cobrindo parte do município de Macaé, a sudoeste, parte do município de Carapebus, ao centro, e parte do município de Quissamã, a nordeste. Em destaque, área do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (vermelho) e rodovias estaduais RJ-178 e RJ-196 (amarelo). Na porção sudoeste do parque temos a área das lagoas Cabiúnas e Comprida, onde o estudo foi realizado (área isolada por linha vermelha). B) Ampliação da área de estudo que inclui as lagoas Cabiúnas (entre os sítios amostrais 1 – 6) e Comprida (entre os sítios amostrais 7 – 9). Os nove sítios estão dispostos em áreas claras, nos topos dos cordões arenosos, na Formação Arbustiva Aberta de *Clusia* (Fonte: Google Earth/Nasa 2007). 18
- Figura 1.1. Variação nos valores do Índice de Morisita Padronizado (I_p) para os grupos de (♦) plantas masculinas com flores vermelhas, (■) plantas femininas, (X) plantas que não floresceram nos anos de 2003 e 2004 e (▲) plantas masculinas com flores brancas, em diferentes tamanhos de quadrante considerados. A linha pontilhada representa os limites de significância para os valores de Morisita, conforme teste de qui-quadrado. 33
- Figura 1.2. Variação dos valores do Índice de Morisita (I_d) para os grupos de (♦) plantas masculinas com flores vermelhas, (■) plantas femininas, (X) plantas que não floresceram nos anos de 2003 e 2004 e (▲) plantas masculinas

com flores brancas, em diferentes tamanhos de quadrante considerados. Valores superiores a 1 sugerem que as plantas estão distribuídas de maneira agregada, enquanto valores inferiores a 1 sugerem que as plantas estão distribuídas de maneira aleatória..... 34

Figura 1.3. A) Mapa esquemático da área de amostragem das 44 plantas de *Clusia hilariana* Schltld., do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. B) Dendrograma gerado por UPGMA com base nas distâncias genéticas (Nei-Gojobori) entre as plantas da área de estudo. As plantas foram classificadas por letras maiúsculas conforme os grupos considerados no estudo: (mb) plantas masculinas com flores brancas, (e) Plantas que não floresceram nos anos de 2003 e 2004, (mv) plantas masculinas com flores vermelhas e (F) plantas femininas..... 36

Figura 1.4. Dendrograma gerado por UPGMA com base nas distâncias genéticas entre os grupos de *Clusia hilariana* Schltld.: (mb) plantas masculinas com flores brancas, (e) plantas que não floresceram nos anos de 2003 e 2004, (mv) plantas masculinas com flores brancas e (F) plantas femininas. Valores entre parênteses representam a proporção de replicatas que apresentaram o respectivo nó em 1000 “bootstraps” e a percentagem de *loci* que suportam cada nó. 38

Figura 1.5. Variação das médias das distâncias Tanimoto entre as plantas de *Clusia hilariana* Schltld., considerando as diferentes escalas espaciais consideradas (linha contínua na cor preta). Linhas em cinza representam os intervalos de confiança de 95 %, obtida por meio de 1000 permutações aleatórias que produziram distribuições nulas, relativa à ausência de estruturação genética nas diferentes escalas. O intervalo de 65 metros não apresentou o número de 30 pares de indivíduos, sendo o teste de Monte Carlo pouco confiável para este intervalo de distância..... 39

Figura 1.6. Número de pares de plantas de *Clusia hilariana* Schltld. por intervalo de distância na área do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Macaé, Rio de Janeiro. 40

- Figura 2.1. Indivíduo de *Augochloropsis rotalis* (Vachal, 1903) coletando pólen em flor masculina de *Clusia hilariana* Schltl. (Clusiaceae), Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. Observe as cores ferrugíneas nas pétalas, característico de flores com mais de um dia de exposição, e a espessura do anel de resina ao redor do sinândrio. 53
- Figura 2.2. Indivíduo de *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) coletando resina em flor feminina de *Clusia hilariana* Schltl. (Clusiaceae), Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. Observe a cor avermelhada do anel de estaminóides. Foto de Izar Aximoff. 54
- Figura 2.3. Indivíduo de *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) coletando pólen de flor masculina de *Clusia hilariana* Schltl. (Clusiaceae), Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. 56
- Figura 2.4. Correlações dos efeitos parciais de cada uma das variáveis consideradas na regressão múltipla usada para explicar a taxa de produção de frutos ($Y = 16,9 - 0,31 X_a + 0,02 X_b - 1,92 X_c$) ($F_{3,49} = 2,85$; $P < 0,05$; $r^2 = 0,14$). (a) Correlação dos efeitos parciais da taxa de produção de frutos e da distância entre a mesma e o indivíduo masculino florido mais próximo. (b) Correlação dos efeitos parciais da percentagem de frutos produzidos por planta e o número de flores do indivíduo masculino mais próximo. (c) Correlação dos efeitos parciais entre a taxa de produção 58
- Figura 3.1. Percentual de visitas dos diferentes grupos de abelhas em flores masculinas e femininas de *Clusia hilariana* Schltl. (Clusiaceae) nas florações de 2003 e 2004, Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. O padrão de coloração das barras corresponde aos valores relativos de visita de: Augochlorini (listras diagonais); *Apis mellifera* L. (área quadriculada); *Trigona spinipes* Fabr. (área pontilhada); *Xilocopa brasiliatorum* L. (área branca), e Euglossina (área preta). 72
- Figura 3.2. Média e erro padrão (caixas) e desvio padrão (barras verticais) da taxa percentual de visitas em flores masculinas (caixa branca) e femininas (caixa hachurada) de *Clusia hilariana* Schltl. (Clusiaceae), nas estações

- reprodutivas de 2003 e 2004, Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. 77
- Figura 3.3. Média, erro padrão (caixas) e desvio padrão (barras verticais) da percentagem de: flores visitadas (caixas com listras verticais), produção de frutos (caixas com listras diagonais), taxa de produção de sementes (caixas com listras horizontais) e flores fecundadas (caixas brancas). Valores estimados para *Clusia hilariana* Schltld. (Clusiaceae), nas estações reprodutivas de 2003 e 2004, Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. 78
- Figura 3.4. Média, erro padrão (caixas) e desvio padrão (barras verticais) da percentagem de flores femininas de *Clusia hilariana* Schltld. (Clusiaceae) visitadas por sítio amostral, na floração de 2004 do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. Linha contínua representa a média de flores femininas visitadas por área na floração de 2003. 80
- Figura 4.1. Esquema da área de estudo no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. Os números representam os cordões arenosos onde foram definidos os sítios amostrais e os respectivos transectos. Em negro as lagoas Cabiúnas (entre os sítios amostrais 1 – 6) e Comprida (entre os sítios amostrais 7 – 9) e em cinza as formações de mata ao redor dos braços das lagoas. 85
- Figura 4.2. Dendrograma baseado na distância genética de Nei (D) para as nove subpopulações de *Clusia hilariana* Schltld. utilizando 390 *loci* polimórficos de AFLP (ver Figura 4.1 para localização das subpopulações dos respectivos sítios amostrais). Valores entre parênteses representam a proporção de replicatas que apresentaram o respectivo nó em 1000 “bootstraps” e a percentagem de *loci* que suportam cada nó. 91

Índice de tabelas

Tabela 0.1. Porcentagem de cobertura vegetal em nove sítios amostrais da formação aberta de <i>Clusia</i> do PNRJ (conforme SAMPAIO <i>et al.</i> , 2005; PIMENTEL <i>et al.</i> , 2007) e as taxas percentuais de produção de frutos nos respectivos sítios amostrais. Valores entre parênteses correspondem ao número de flores avaliadas. Os números dos sítios correspondem à numeração adotada por Martins <i>et al.</i> (2007) (ver também Figura 0.3).....	13
Tabela 0.2. Polimorfismo obtido em <i>Clusia hilariana</i> Schltldl, em duas espécies de <i>Clusia</i> estudadas por HALE <i>et al.</i> (2002). Os dados foram obtidos a partir de <i>loci</i> microssatélites isolados em <i>C. minor</i> (<i>CIm</i>) e <i>C. nemorosa</i> (<i>CIn</i>) por HALE <i>et al.</i> (2002). O sinal “X” foi colocado nos <i>loci</i> não amplificados. Os dados de HALE <i>et al.</i> (2002) podem ser acessados no GenBank por meio dos números AY095353 à AY095365.....	14
Tabela 1.1. Porcentagem de <i>loci</i> polimórficos, <i>He</i> (heterozigosidade média esperada por subpopulação) e distâncias genéticas Nei-Gojobori (número de diferenças) intra e intergrupos de plantas de <i>Clusia hilariana</i> Schltldl.. Os grupos foram definidos como: plantas masculinas com flores vermelhas, plantas femininas, plantas masculinas com flores brancas e plantas que não floresceram nos anos de 2003 e 2004. As distâncias foram calculadas por meio do programa MEGA versão 3.1 (KUMAR <i>et al.</i> , 2004), com base em polimorfismo de bandas de AFLP, gerados por oito combinações de iniciadores <i>Eco</i> e <i>Mse</i>	37
Tabela 2.1. Número de plantas e flores de <i>Clusia hilariana</i> Schltldl. observadas, número de plantas e flores visitadas, número de visitas e o tempo total das visitas de cada grupo de abelha (Considerando 516 h e 15 min de observação em flores femininas e 526 h e 15 min de observação em flores masculinas).....	55
Tabela 3.1. Valores percentuais de: (1) flores polinizadas, (2) flores com óvulos fecundados e (3) óvulos fecundados em cada uma das localidades amostradas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro,	

Brasil, floração de 2003 e 2004. Valores entre parênteses representam o número de flores analisadas ou o número de óvulos contabilizados por área. Médias totais foram seguidas dos desvios padrões.	75
Tabela 3.2. Percentagem de visitas em flores masculinas e femininas de <i>Clusia hilariana</i> Schltl. (Clusiaceae) e taxa de produção de frutos e sementes nas estações reprodutivas de 2003 e 2004, Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. Valores entre parênteses representam o número de flores avaliadas para se calcular a taxa de visitação e a taxa de produção de frutos e, no cálculo da percentagem de sementes, o número de frutos que tiveram as sementes contadas. Os valores percentuais de produção de sementes são relativos aos valores médios de óvulos por flor (104 óvulos), multiplicado pelo número de frutos contados (valores entre parênteses).....	76
Tabela 4.1. Estimativa de diversidade genética em subpopulações de <i>C. hilariana</i> , número total de <i>loci</i> AFLP, porcentagem de <i>loci</i> polimórficos, <i>He</i> (heterozigosidade média esperada por subpopulação) e <i>Ht</i> (heterozigosidade média esperada total).	89
Tabela 4.2. Estimativa de <i>Fst</i> para as nove subpopulações de <i>C. hilariana</i> utilizando 390 <i>loci</i> polimórficos de AFLP.	90
Tabela 4.3. Distribuição da variabilidade genética dentro e entre subpopulações de <i>C. hilariana</i> do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, conforme resultados da análise de variância molecular (AMOVA). O valor de <i>P</i> foi calculado considerando os valores de Φ_{st} e da variância obtidos em comparação com uma distribuição nula dos mesmos valores, computados 1000 vezes após a realocação de padrões de bandas obtidos entre os indivíduos analisados. Valores de $P < 0,05$ rejeitam a hipótese nula de ausência de diferenciação genética.	92

Lista de Abreviaturas

CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
DAB	diâmetro à altura da base
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucléico trifosfatado
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
G	grama
Há	hectares
IVI	índice de valor de importância (média de 3 valores percentuais)
Ln	logaritmo neperiano
M	molar
M	metros
Min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
°C	graus Celsius
Pb	pares de base
PCR	reação da polimerase em cadeia
pH	potencial hidrogeniônico
Pmol	picomoles
PVP	polivinilpirrolidona
Rpm	rotações por minuto
TAE	tampão: tris, acetato e edta
TE	tampão: tris e edta
Tris	tri-hidroximetil aminometano
U	unidade de enzima
V	voltz
Hg	nanograma
Mg	micrograma
μL	microlitro

PRIMEIRA PARTE:

Introdução geral

Introdução geral¹

0.1. Biologia floral do gênero *Clusia*

Das 250-400 espécies que compõem o gênero *Clusia* (BITTRICH e AMARAL, 1996a; PIPOLY *et al.*, 1998), existem dados de biologia reprodutiva para apenas 28 delas. Além do limitado conhecimento de biologia reprodutiva, os trabalhos restringem-se a descrições de biologia floral de uma ou mais espécies em uma reduzida escala espacial e temporal. Dos dados de biologia floral do grupo, destaca-se a ocorrência de características raras em angiospermas que ocorrem de maneira combinada ou isolada nas diferentes espécies, tornando o grupo especialmente peculiar do ponto de vista da biologia reprodutiva. As evoluções das características são relacionadas entre si pelos diferentes autores, fornecendo um rico quadro de hipóteses a serem testadas.

A resina é o caráter mais abordado desde os primeiros artigos de biologia reprodutiva do grupo. Esse interesse se deve à raridade da ocorrência desse recurso entre as angiospermas, limitado aos gêneros *Dalechampia* (Euphorbiaceae; ARMBRUSTER, 1984; ARMBRUSTER e WEBSTER, 1979), *Chrysochlamys*, *Tovomitopsis*, *Clusia* (tribo Clusieae em Clusiaceae; GUSTAFSSON *et al.*, 2002), *Clusiella* (Clusiaceae; BITTRICH e AMARAL, 1996a e 1996b) e, por fim, *Moronobea* (Clusiaceae; VICENTINI e FISCHER, 1999). Atualmente os estudos mais completos sobre o papel da resina estão relacionados a trabalhos desenvolvidos em *Dalechampia*

¹ A Introdução é, em grande parte (trechos dos itens 1, 2 e 3 a seguir), a tradução de um capítulo publicado em recente revisão sobre o gênero *Clusia*: MARTINS, R. L., WENDT, T., MARGIS, R., SCARANO, F. R., 2007, "Reproductive Biology". In: Lüttge, U. (ed), *Clusia a woody neotropical genus of remarkable plasticity and diversity*, Ecological Studies 194, pp. 73-94, Berlin, German, Springer-Verlag.

(ARMBRUSTER, 1986; ARMBRUSTER *et al.*, 1992; ARMBRUSTER e HERZIG, 1984; ARMBRUSTER e STEINER, 1992; ARMBRUSTER e WEBSTER, 1979; 1981 e 1982).

Os primeiros registros de visitas de abelhas à procura de resina em flores de *Clusia* foram feitos concomitantemente por SKUTCH (1971) e JANZEN (1971), abordando a interação entre resina-visitante e a importância da resina para Euglossina, respectivamente. Para as abelhas, a resina é um dos elementos utilizados na construção de ninhos e na defesa contra ataques de formigas (ARMBRUSTER, 1984; ARMBRUSTER e WEBSTER, 1979; BITTRICH e AMARAL, 1996a,b; SAKAGAMI *et al.*, 1989). À resina também são atribuídas propriedades antifúngicas e bactericidas úteis às abelhas que, segundo LOKVAN e BRADDOCK (1999), são resultantes de pressão seletiva. A dependência de cruzamentos para manutenção das populações desse grupo de plantas predominantemente dióico levou a uma abordagem adaptacionista da interação resina - abelhas Euglossina, que são capazes de voar grandes distâncias. Em função disso, é recorrente a determinação *a priori* da importância das abelhas Euglossina sem que haja testes de eficiência de polinizadores (ver ARMBRUSTER, 1984; JANZEN, 1971; LOPES e MACHADO, 1998; ROUBIK, 1992). Como exemplo, apesar da maioria das espécies de *Clusia* ser visitada por outros grupos de abelhas, Euglossina é considerado o visitante mais importante para: *C. arrudae* Pl. et Tr. (CARMO e FRANCESCHINELLI, 2002), *C. grandiflora* Splitg. (ARMBRUSTER, 1984; BITTRICH e AMARAL, 1997), *C. rosea* Jacq. (ARMBRUSTER, 1984), *C. nemorosa* G. Mey (BITTRICH e AMARAL, 1997; LOPES e MACHADO, 1998; MESQUITA e FRANCISCON, 1995), *C. insignis* Sem., *C. leprantha* Mart., *C. reggerioides* Pl. et Tr., *C. pana-panari* (Obley) Choisy (BITTRICH e AMARAL, 1997), *C. pusilla* Steyerem. (LOPES e MACHADO, 1998) e *C. lanceolata* Camb. (CORREIA *et al.*, 1989).

A dioecia é um caráter comum à tribo Clusieae Choisy, à qual *Clusia* pertence, porém é um caráter presente em apenas 6 % das angiospermas (RENNER e RICKLEFS, 1995). Em função disso, as variações no sistema sexual dióico são tão interessantes quanto a ocorrência da dioecia. Como exemplos, foram registrados hermafroditismo em *C. scrobiculata* Benoist (BITTRICH e AMARAL, 1996a) e populações com ginodioecia em *C. minor* L. (MAGUIRE, 1976), *C. nemorosa* (BITTRICH e AMARAL, 1997; LOPES e MACHADO, 1998) e *C. schomburgkiana* (Pl. et Tr.) Benth. ex Engl. (BITTRICH e AMARAL, 1996a, 1997).

Ainda relacionado à dioecia, a ocorrência de automimetismo por flores femininas também foi descrita para espécies do grupo. O automimetismo se dá quando flores sem recurso de uma dada espécie apresentam características que imitam flores com recursos florais desta mesma espécie (DAFNI, 1984; LITTLE, 1983). O automimetismo é comumente observado em flores femininas de espécies dióicas, cujos polinizadores são primariamente coletores de pólen. Em *Clusia*, essa característica foi descrita para *C. criuva* Camb.(CORREIA *et al.*, 1993) e *C. gundlachii* Stahl. (GUSTAFSSON, 2000), no entanto a visitação de abelhas coletoras de pólen em flores femininas com resina também é comum no gênero. Nesses casos as visitas ocorrem por engano, podendo promover a polinização, como em *C. insignis* e *C. pusilla* (BITTRICH e AMARAL, 1996a, 1997). O quadro descrito deixa dúvidas se a visitação por engano é induzida por automimetismo ou pela baixa especificidade dos visitantes florais.

A polinização por engano, descrita para *Clusia*, está geralmente relacionada à visitação por abelhas inespecíficas desinteressadas na coleta de resina. A polinização por engano em *Clusia* também está relacionada a pequenas abelhas com pequena autonomia de vôo, que são mais eficientes quando a distância entre plantas é pequena, favorecendo a visitação de um maior número de flores (BAWA e OPLER, 1975). Dessa forma,

considerando a habilidade de algumas espécies de *Clusia* em colonizar áreas abertas e formar populações extensas, a eficiência de pequenas abelhas que voam pequenas distâncias pode estar relacionada a esse tipo de distribuição espacial.

O mais controverso dos caracteres discutidos nos trabalhos de biologia floral do grupo está relacionado à reprodução por agamospermia (MESQUITA e FRANCISCON, 1995), que se refere à produção de frutos a partir de flores não fertilizadas. Inicialmente descrita para *C. rosea* (MAGUIRE, 1976), *C. minor* (HAMMEL, 1986; MAGUIRE, 1976), *C. fluminensis* Pl. et Tr. (CORREIA, 1983) e *C. lanceolata* Camb. (CORREIA *et al.*, 1999), a ocorrência de agamospermia permanece relacionada apenas às populações estudadas por HAMMEL (1986) e MAGUIRE (1976), que relacionaram a presença deste caráter com base em inferências. A presença de agamospermia abre uma discussão sobre o aumento da capacidade de colonizar novos ambientes, por meio da produção de propágulos, independentemente da polinização, o que pode ser vantajoso para plantas dióicas (CRAWLEY, 1997; MARTINS e OLIVEIRA, 2003). Acompanhando as descrições de agamospermia, existem evidências de que a reprodução vegetativa pode contribuir para a eficiência de algumas espécies do gênero. Hipóteses relativas à importância da propagação clonal na manutenção de populações têm sido apresentadas para *Clusia hilariana* Schlttdl. (FARIA *et al.*, 2006; MATAALLANA *et al.*, 2005; SCARANO *et al.*, 2004), que ainda apresenta várias das peculiaridades reprodutivas comuns ao gênero *Clusia* e raras em angiospermas (FARIA *et al.*, 2006). Além da presença dos caracteres do gênero, *C. hilariana* se presta para testar hipóteses de ecologia da polinização do grupo, por ser abundante localmente e compor uma formação vegetacional (restingas arbustivas abertas) organizada em ilhas.

0.2. O caso da *Clusia hilariana*

Clusia hilariana é uma árvore dióica, comum a formações vegetacionais litorâneas dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, que pode apresentar até 8m de altura (Figura 0.1.A). As flores de ambos os sexos apresentam de 4 a 6 cm e, geralmente, são pêndulas. Flores masculinas podem estar dispostas em inflorescências de 2 a 3 flores (Figura 0.1.B), enquanto as flores femininas estão isoladas em pontas de ramos (Figura 0.1.C). As flores são brancas com tons de rosa que vão ficando mais realçadas próximo à base das pétalas, podendo assumir tons de vermelho-sangue (Figura 0.1.E) (FARIA *et al.*, 2006). Algumas plantas masculinas não apresentam cores nas pétalas (Figura 0.1.D) e esse padrão é consistente ao longo dos anos (*Capítulo 2 - Segunda Parte*). Nas flores masculinas o sinândrio forma uma estrutura hemisférica expondo, ao longo de toda a superfície da estrutura, os poros das anteras (Figura 0.1.D). Nas flores femininas o ovário globular súpero também apresenta um aspecto hemisférico com 7 a 10 estigmas sésseis fundidos aos respectivos carpelos (Figura 0.1.C). A divisão entre os carpelos é evidente, dando um aspecto segmentado ao ovário. Ao redor do androceu e do gineceu, um anel de estaminódios vermelho-escuros produz resina. Plantas masculinas e femininas não apresentam diferenças em termos metabólicos (LIEBIG *et al.*, 2001), no entanto a resina parece ser mais abundante em flores masculinas (FARIA *et al.*, 2006).

Conforme dados de FARIA *et al.* (2006), para as plantas de *C. hilariana* do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), o período de floração vai do início de outubro até o início de janeiro, durante a estação chuvosa. No final do período de floração os ovários restantes se apresentam como cápsulas segmentadas com superfícies estigmáticas persistentes. A deiscência das cápsulas ocorre no período entre março e junho, expondo as sementes envoltas em um arilo laranja-escuro (FARIA *et al.*, 2006) (Figura 0.2).

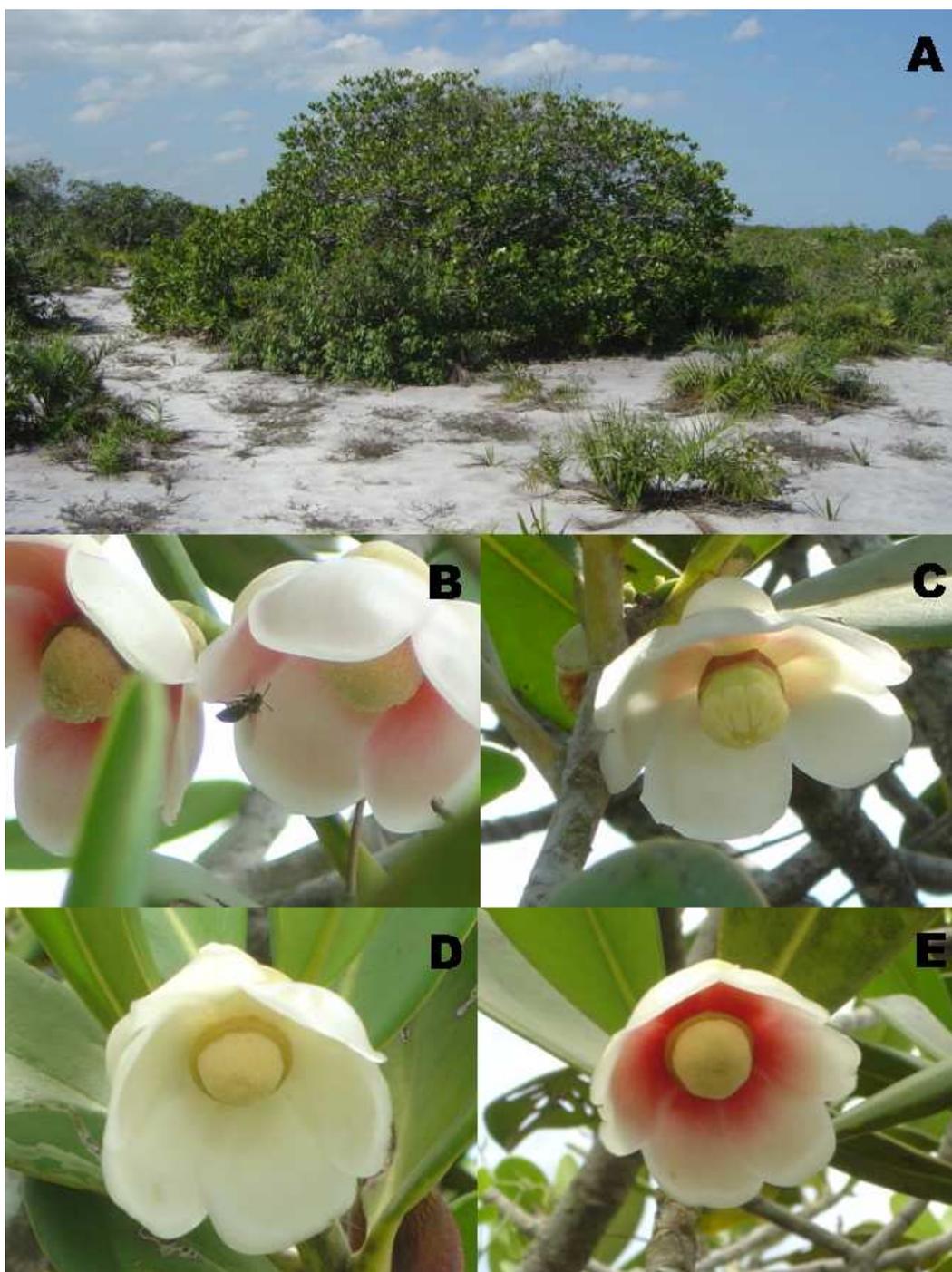


Figura 0.1. *Clusia hilariana* Schlttdl. no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro. A) Moita de vegetação da Formação Arbustiva Aberta de *Clusia* apresentando um indivíduo masculino de *C. hilariana* na posição central da moita. B) Flores masculinas de *C. hilariana* em inflorescência. C) Flor feminina de *C. hilariana*. D e E) Variação de tons de rosa nas pétalas de flores masculinas de *C. hilariana*.



Figura 0.2. Fruto deiscente de *Clusia hilariana* Schltdl. expondo as sementes envoltas no arilo laranja conspícuo. Foto de Fábio Antônio Ribeiro Matos.

O interesse relativo à biologia reprodutiva de *C. hilariana* é devido à importância ecológica dessa espécie para a estrutura e funcionamento do ecossistema de restinga do Norte do estado do Rio de Janeiro, mais especificamente no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ). *Clusia hilariana* ocorre em pelo menos duas das dez formações vegetacionais que compõem a restinga do PNRJ (ARAUJO *et al.*, 1998), sendo a espécie com maior frequência relativa, maior abundância relativa e maior dominância relativa da Formação Arbustiva Aberta de *Clusia* (ARAUJO *et al.*, 2004). *Clusia hilariana* atua como uma espécie facilitadora (ou *nurse plant*, conforme FRANCO e NOBEL 1989) para a

germinação e o estabelecimento de espécies na comunidade (DIAS *et al.*, 2005; DIAS e SCARANO, 2007; SCARANO, 2002). Como tal, se trata de uma das principais responsáveis pela riqueza de espécies nas moitas deste ambiente oligotrófico. O papel facilitador está relacionado com o sombreamento, a geração de abrigo para fauna dispersora de sementes, o acúmulo de biomassa e as propriedades da ciclagem da biomassa e dos nutrientes assimilados por *C. hilariana* (DIAS *et al.*, 2005, 2006).

Um dos primeiros estudos relacionados à reprodução de *C. hilariana* avaliou a estrutura da população em 0,5 ha da Formação Aberta de *Clusia* do PNRJ (CORREIA, 1998). Este estudo encontrou aproximadamente 68 % de indivíduos adultos, considerando três classes de tamanho definidas em função do diâmetro à altura da base (DAB). Essa estruturação da população sugere que a taxa de regeneração e recrutamento de *C. hilariana* não seja contínua, apresentando mais adultos do que jovens. Esse mesmo trabalho definiu para as plantas com altura inferior a 50 cm ($n= 56$), quais eram originadas por propagação vegetativa e quais resultavam de eventos de germinação de sementes. Por fim, 28 % das plantas com altura inferior a 50 cm eram originadas por propagação vegetativa enquanto, dos 72 % restantes, 2 % resultaram de sementes que germinaram no solo e 70 % estavam associadas à germinação em tanques de bromélias (principalmente nas bromélias-tanque *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. e *Neoregelia cruenta* (Graham) L.B.Sm.; SAMPAIO *et al.*, 2005; SCARANO, 2002; SCARANO *et al.*, 2004). Esse padrão também foi observado para a congênere *C. fluminensis*, freqüente em regiões ao sul do PNRJ (MACEDO e MONTEIRO, 1987; ZALUAR, 2002). A dependência de sítios específicos para a germinação e a estruturação da população são ocorrências inesperadas para uma espécie tão abundante localmente, o que sugere que altas taxas de regeneração devam ser fenômenos intermitentes.

Outros estudos relacionados à reprodução de *C. hilariana* encontraram uma baixa produção de frutos e baixa taxa de visitação (FARIA *et al.*, 2006), contrariando o pressuposto de que espécies de plantas com alta densidade apresentam uma taxa de visitação superior a plantas com baixa densidade (conforme ANTONOVICS e LEVIN, 1980). Nos dados obtidos por FARIA *et al.* (2006) em duas estações reprodutivas, *C. hilariana* apresentou uma taxa de produção de frutos de aproximadamente 25 %, inferior aos 52,6 % esperado para plantas dióicas (média obtida para 31 plantas dióicas por SUTHERLAND e DELPH, 1984). Em comparação com congêneres dióicas, os valores de produção de frutos em *C. hilariana* encontrados por FARIA *et al.* (2006) são, de fato, baixos. Em *C. criuva* foi encontrado 90 % de produção de frutos em polinizações naturais (CORREIA *et al.*, 1993), enquanto que para *C. nemorosa* foi encontrado 34 % de produção de frutos em polinização natural e 86 % em polinização manual (LOPES e MACHADO, 1998). FARIA *et al.* (2006) atribui essa baixa produção de *C. hilariana* à escassez de polinizadores naturais em ambientes de restinga. A baixa produção de frutos devido à reduzida taxa de visitação e ausência de agamospermia (de acordo com FARIA *et al.*, 2006), somada à dependência de sítios específicos de germinação de sementes *in situ* (CORREIA, 1998; SCARANO, 2002; SCARANO *et al.*, 2004), levou FARIA *et al.* (2006) a sugerir que a dominância de *C. hilariana* só poderia ser explicada (1) pelo recrutamento em anos bons com uma copiosa produção de frutos e sementes e/ou (2) pela persistência e/ou propagação de genótipos por meio da propagação vegetativa.

Para obter uma resposta definitiva a respeito da importância da produção de frutos na composição da população e a eficiência da polinização são necessários estudos que avaliem a polinização em escalas temporais e espaciais maiores e o grau de estruturação genética, ou seja, a existência de indivíduos geneticamente próximos (aparentados) espacialmente próximos. Entender esses eventos ligados à reprodução de *C. hilariana* é

essencial para se avaliar a vulnerabilidade da população dessa espécie, que tem papel chave na estruturação da comunidade e no funcionamento do ecossistema de restinga (DIAS *et al.*, 2005, 2006). Para tanto, o presente trabalho tem como objetivo monitorar eventos que vão desde a visitação de flores até a produção de frutos em mais duas estações reprodutivas, além das duas estações já estudadas para *C. hilariana* por FARIA *et al.* (2006). A escala espacial também foi ampliada cobrindo 5,06 ha ao longo de uma faixa de restinga de 1,5 km de largura por 5 Km de comprimento da costa. Os trabalhos anteriores de FARIA *et al.* (2006) e CORREIA (1998) cobriram, respectivamente, uma estação reprodutiva em uma área de 0,5 ha, e duas estações em uma área de 2 ha. A estruturação genética foi avaliada em plantas dispostas em uma área de 90x90 m para verificar a importância da propagação vegetativa na colonização dos ambientes de restinga.

0.3. Resultados já publicados

A revisão em Martins *et al.* (2007), dos trabalhos de biologia reprodutiva do gênero *Clusia*, em geral, e de *Clusia hilariana*, em particular, apresenta as principais abordagens tratadas na tese. A seguir, são detalhados dois conjuntos de resultados que foram em parte responsáveis pela definição das abordagens dos capítulos da tese.

Efeito da vegetação local sobre a taxa de produção de frutos – Os dados de biologia reprodutiva, tratados em detalhes nos capítulos que se seguem, se prestaram a avaliar se a diferença na taxa de produção de frutos das áreas mantinha-se consistente ao longo dos anos, o que seria um indicativo do efeito de atributos intrínsecos das mesmas sobre a taxa de produção de frutos. O principal fator avaliado foi o efeito da taxa de cobertura

vegetal, que se refere à projeção da copa das moitas de vegetação sobre o terreno dos cordões arenosos da restinga (PIMENTEL *et al.*, 2007; SAMPAIO *et al.*, 2005). A expectativa aqui era que uma maior cobertura vegetal facilitaria a ocorrência de eventos polinização por engano, efetuado por abelhas inespecíficas que, aparentemente, foram muito abundante na área de estudo, o que estaria refletido numa maior taxa de produção de frutos (ver BAWA e OPLER, 1975). No entanto, a variação estocástica na taxa de produção de frutos das áreas, apresentando num mesmo sítio valores de 46 e 10 % em diferentes anos frustrou esta expectativa, conforme a tabela 0.1. Este resultado também permitiu concluir que a diversidade genética pode ser pouco importante na produção de dados tão discrepantes de frutificação, uma vez que, caso este fator fosse determinante da variação, o esperado seria a ocorrência de valores constantes em diferentes anos. Este resultado era esperado considerando-se a capacidade limitada de fluxo gênico promovida pelos visitantes registrados para *C. hilariana* (COLES e FOWLER, 1976).

Tabela 0.1. Porcentagem de cobertura vegetal em nove sítios amostrais da formação aberta de *Clusia* do PNRJ (conforme SAMPAIO *et al.*, 2005; PIMENTEL *et al.*, 2007) e as taxas percentuais de produção de frutos nos respectivos sítios amostrais. Valores entre parênteses correspondem ao número de flores avaliadas. Os números dos sítios correspondem à numeração adotada por Martins *et al.* (2007) (ver também Figura 0.3).

Sítios amostrais	2004	2005	% cobertura
1	27,4 (58)	16,2 (69)	34,6
2	30,4 (49)	17,8 (73)	33,0
3	45,7 (49)	19,4 (62)	38,2
4	46,0 (58)	10,0 (60)	56,4
5	13,3 (48)	11,6 (69)	28,5
6	24,4 (56)	17,7 (62)	29,5
7	28,7 (50)	15,9 (63)	37,0
8	27,0 (50)	33,3 (55)	20,0
9	15,2 (49)	32,2 (60)	28,0

Diversidade genética a partir da análise de microssatélites - Dados moleculares preliminares obtidos por meio de iniciadores do tipo SSR (microssatélites), que avaliam regiões onde ocorrem repetições de pequenas seqüências, baseado no conhecimento prévio das seqüências que flanqueiam essas regiões, registraram uma baixa diversidade de alelos (Tabela 0.2.). O padrão obtido pode estar relacionado à baixa diversidade genética e/ou à fixação de alelos nos respectivos *loci*. Esse resultado inconclusivo se deu pelo fato dos iniciadores não terem sido desenvolvidos especificamente para amostrar *loci* de alta diversidade em *C. hilariana*. No entanto, os dados de marcadores microssatélites foram essenciais para a definição do sítio amostral onde se daria o estudo da estruturação genética, que é o escopo do Capítulo 1 da presente tese.

Tabela 0.2. Polimorfismo obtido em *Clusia hilariana* Schtdl, em duas espécies de *Clusia* estudadas por HALE *et al.* (2002). Os dados foram obtidos a partir de *loci* microssatélites isolados em *C. minor* (*CIm*) e *C. nemorosa* (*CIn*) por HALE *et al.* (2002). O sinal “X” foi colocado nos *loci* não amplificados. Os dados de HALE *et al.* (2002) podem ser acessados no GenBank por meio dos números AY095353 à AY095365.

<i>Loci</i>	HALE <i>et al.</i> (2002)		Esta tese		
	Faixa de tamanho dos fragmentos (bp) para 17 espécies de <i>Clusia</i>	Número de alelos		Faixa de tamanho dos fragmentos (bp) em <i>C. hilariana</i>	Número de alelos <i>C. hilariana</i> (n=38)
		<i>C. minor</i> (n=5)	<i>C. ducu</i> (n=5)		
<i>CIm1</i>	166-262	6	6	-	X
<i>CIm2</i>	172-200	4	2	82 – 85	2
<i>CIm3</i>	99-151	4	X	-	X
<i>CIm4</i>	169-241	1	2	98	1
<i>CIm5</i>	185-195	3	2	70	1
<i>CIn1</i>	211-279	X	X	-	X
<i>CIn2</i>	211-249	4	3	260-270	3
<i>CIn3</i>	136-168	3	4	137 -145	2
<i>CIn5</i>	128-255	2	2	-	X
<i>CIn6</i>	165-239	2	2	180	1
<i>CIn7</i>	189-231	2	3	224	1
<i>CIn8</i>	175-233	5	6	180	1
<i>CIn9</i>	137-247	3	5	-	X
Número total de alelos		39	37		12

0.4. Área de estudo

Restinga é um termo usado na literatura desde 1785 por geólogos, historiadores, botânicos e ecólogos, designando elementos distintos (SUGUIO e TESSLER, 1984).

Geologicamente, o termo define as planícies arenosas de sedimentação quaternária e gênese variada, encontradas ao longo de 79 % da costa brasileira (BIGARELA *et al.*, 1965; FREIRE, 1990). Em sentido botânico, as restingas são vegetações litorâneas formadas por espécies provenientes de ecossistemas limítrofes (FREIRE, 1990). Diferentes condições dessa extensa região geográfica envolvem uma correspondente variedade de comunidades vegetais, distribuídas em mosaico (ARAUJO, 2000; SUGIYAMA, 1998). Este conjunto vegetacional inclui formações herbáceas de beira de praia, formações arbustivas, formações florestais em depressões e sobre cordões arenosos e ainda vegetação de margens de lagoas (ARAUJO, 1992).

O PNRJ, área de estudo, localiza-se na região norte do estado do Rio de Janeiro (22°-22°23' S; 41°15'-41°35'W). A temperatura média anual é de 22,6° e a precipitação de 1164mm. A distribuição de chuvas é sazonal, sendo o verão a estação com maior índice pluviométrico, 189 mm em janeiro (FIDERJ, 1978). Nos meses mais secos - junho, julho e agosto - o solo apresenta deficiência hídrica e de outubro a janeiro ocorre reposição de água no solo (HENRIQUES *et al.*, 1986). O Parque possui 14.140 ha, estendendo-se por uma faixa de 60 km de comprimento por 10 km de largura em áreas dos municípios de Macaé, Carapebus e Quissamã (ARAUJO *et al.*, 1998). Os depósitos de areia dos diferentes eventos de glaciação formam cordões arenosos paralelos à costa. Os cordões são entrecortados por lagoas perpendiculares à faixa da costa, resultantes de antigos deltas de rios represados pela deposição de sedimento marinho (Figura 0.3.A). Entre os cordões arenosos existem áreas que são permanentemente inundadas por projeções das lagoas e áreas periodicamente inundadas em função da variação do lençol freático e do regime de chuvas.

Estudos no PNRJ identificaram 10 comunidades vegetais (ARAUJO *et al.*, 1998), associadas a condições ambientais específicas como oligotrofia, grau de dessecação,

temperatura, salinidade e grau de inundação (SCARANO *et al.*, 2005). Dentre as comunidades listadas para a área do PNRJ temos: Formação de Mata Permanentemente Inundada, Formação de Mata Periodicamente Inundada; Formação de Mata de Cordão Arenoso, Formação Halófila-Psamófila Reptante, Formação Herbácea Brejosa, Formação Arbustiva Fechada de Pós-praia, Formação Arbustiva Aberta de *Clusia*, Formação Arbustiva Aberta de Ericacea, Formação Arbustiva Aberta de Palmae, e Vegetação Aquática (ARAUJO *et al.*, 1998).

O trabalho foi realizado em plantas da Formação Aberta de *Clusia* que é a formação vegetacional mais extensa do PNRJ, cobrindo 40 % da área total do parque (HENRIQUES *et al.*, 1986). Essa formação localiza-se nas áreas de topografia mais alta, a uma distância de até 3 metros do lençol freático. A vegetação está distribuída em ilhas densas que variam de tamanho de $< 1\text{m}^2$ até $> 1000\text{m}^2$. Essas ilhas são intercaladas com áreas de areia nua com vegetação herbácea e esparsa, representada basicamente pela palmeira *Allagoptera arenaria* (Gomes) Kuntze, pelas bromélias *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. e *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith e o cactus *Pilosocereus arrabidae* (Lem.) Byl. e Rowl. (ARAUJO *et al.*, 1998). *Clusia hilariana* é a espécie arbórea dominante fitossociologicamente (maior Valor de Importância = frequência relativa + abundância relativa + dominância relativa, PIMENTEL *et al.*, 2007) e costuma ocupar uma posição central nas moitas de vegetação (Figura 0.1.A).

Foram estudadas plantas de *C. hilariana* das áreas da Formação aberta de *Clusia* ao redor das lagoas de Cabiúnas e Comprida (Figura 0.3.B). As plantas estudadas estavam incluídas em nove sítios amostrais de 75/75m, totalizando 5,06 ha, distribuídos em uma área total de aproximadamente 12 Km². Seis sítios amostrais (# 1 a 6) foram definidos no entorno da lagoa de Cabiúnas e três (# 7 a 9) no entorno da lagoa Comprida (Figura 0.3.B). Os nove sítios estavam dispostos no topo dos cordões arenosos distantes,

no mínimo 50 m das matas e áreas periodicamente inundadas. O sítio amostral número 5 (Figura 0.3.B) foi definido dentro da área do Programa de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração (PELD - Brasil, site 5; ver BARBOSA *et al.*, 2004; SCARANO *et al.*, 2004), que possui uma ampla base de dados ecológica (ver item 0.2, acima). Apesar dos estudos prévios, todas as plantas femininas e masculinas de *C. hilariana* foram novamente mapeadas.

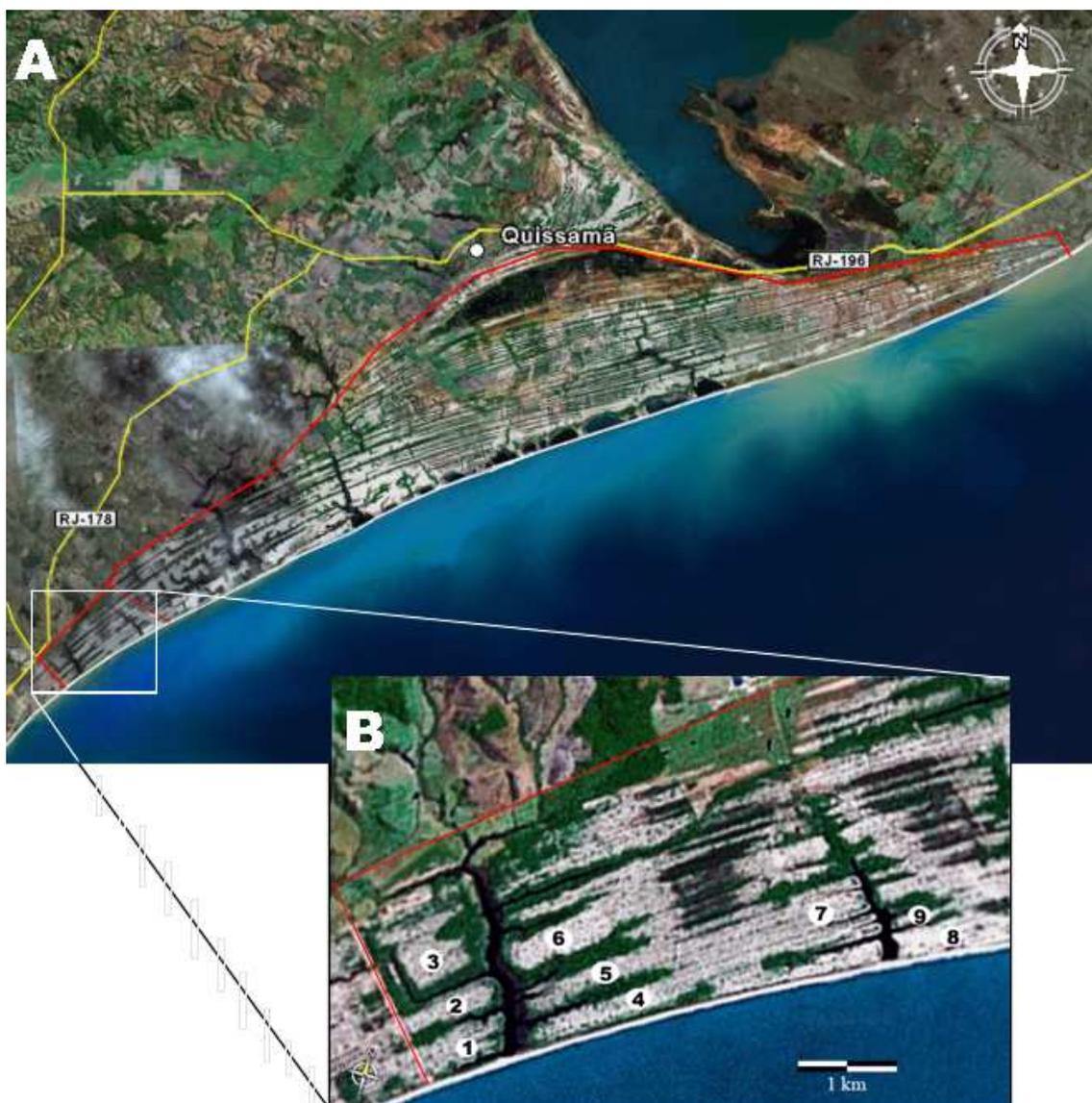


Figura 0.3. Região Norte Fluminense entre as coordenadas $21^{\circ}21' - 22^{\circ}58' S$ e $41^{\circ}10' - 41^{\circ}44' W$. A). Região costeira cobrindo parte do município de Macaé, a sudoeste, parte do município de Carapebus, ao centro, e parte do município de Quissamã, a nordeste. Em destaque, área do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (vermelho) e rodovias estaduais RJ-178 e RJ-196 (amarelo). Na porção sudoeste do parque temos a área das lagoas Cabiúna e Comprida, onde o estudo foi realizado (área isolada por linha vermelha). B) Ampliação da área de estudo que inclui as lagoas Cabiúna (entre os sítios amostrais 1 – 6) e Comprida (entre os sítios amostrais 7 – 9). Os nove sítios estão dispostos em áreas claras, nos topos dos cordões arenosos, na Formação Arbustiva Aberta de *Clusia* (Fonte: Google Earth/Nasa 2007).

0.5. Estrutura e organização da tese

Além desta Primeira Parte, que se encerra neste item, a tese possui outras duas partes. A Segunda parte apresenta quatro capítulos que consistem em estudos completos e independentes, porém com um encadeamento lógico. A Terceira Parte apresenta uma discussão geral e as conclusões, integrando os vários aspectos levantados pelas duas partes anteriores da tese.

O Capítulo 1, da Segunda Parte, teve por objetivo definir a importância relativa da reprodução sexual da espécie para a colonização da área de restinga estudada. Assim, a pergunta que este capítulo se propôs a responder foi se as populações de *C. hilariana* são geneticamente estruturadas e/ou, predominantemente, formadas a partir da reprodução clonal? O capítulo levou em consideração todos os indivíduos de *C. hilariana* amostrados no sítio amostral 6, que segundo estudos preliminares, com marcadores do tipo SSR, apresentaram uma maior diversidade de alelos e uma visual segregação de morfotipos florais. A estruturação genética foi avaliada com base no polimorfismo gerado por marcadores AFLP (polimorfismo com base no comprimento dos fragmentos amplificados), e permitiram estimar a importância da produção de sementes para a manutenção das populações de *C. hilariana*.

Com base nos dados do Capítulo 1, que sugere que a polinização e a dispersão mantêm a diversidade genética das populações de *C. hilariana*, o Capítulo 2 estudou parte da biologia reprodutiva de *C. hilariana*, considerando as características florais e o padrão de apresentação de flores por plantas masculinas e femininas. As características das flores foram consideradas dentro do modelo de polinização por engano e automimetismo floral. A taxa de produção de frutos foi relacionada à intensidade de

floração das plantas masculinas e à proximidade entre plantas masculinas e femininas, conforme esperado no modelo automimético.

No Capítulo 3, as etapas da reprodução de *C. hilariana* referentes às taxas de visitação (1), de polinização (2), de fecundação (3), de produção de frutos (4) e de produção de sementes (5), foram correlacionadas, para verificar a existência de restrições ou obstáculos à reprodução sexuada de *C. hilariana*. A ampla variação na produção de frutos foi considerada como um atributo do sistema de polinização por engano, conferindo uma função adaptativa para a alta produção de flores, ao contrário do sugerido pela hipótese de fracasso na polinização, sugerida por FARIA *et al.* (2006) para *C. hilariana*.

No Capítulo 4 foi avaliada a diversidade genética de nove subpopulações de *C. hilariana*, distribuídas nas áreas dos sítios amostrais. Os dados de heterozigosidade, de estruturação genética, da variação genética intra- e interespecífica e do processo de polinização (apresentados no Capítulo 2 e 3) permitiram inferir sobre o fluxo gênico entre as subpopulações e sobre o processo de colonização dos ambientes de restinga.

A Terceira e conclusiva parte da tese apresenta: uma Discussão geral, relacionando os principais achados e tópicos menos explorados nos capítulos específicos, e uma Conclusão, listando os pontos mais importantes da tese.

SEGUNDA PARTE:

Capítulo 1: Importância relativa da reprodução vegetativa de *Clusia hilariana* Schltl. (Clusiaceae) para a colonização dos ambientes de restinga

Capítulo 2: Automimetismo floral em *Clusia hilariana* Schltl. (Clusiaceae)

Capítulo 3: Produção de flores e polinização por engano em *Clusia hilariana* Schltl. (Clusiaceae)

Capítulo 4: A variabilidade genética de *Clusia hilariana* Schltl. (Clusiaceae)

Capítulo 1

Importância relativa da reprodução vegetativa de *Clusia hilariana* Schldl. (Clusiaceae) para a colonização dos ambientes de restinga

1.1. Introdução

A co-ocorrência de cerca de 80 % das espécies de restinga em áreas de Mata Atlântica revela a importância destas florestas para a colonização destes ambientes, em geral, abertos e oligotróficos (ARAUJO, 2000). Em teoria, as espécies colonizadoras deveriam se mostrar menos dependentes de polinizadores específicos como uma exaptação favorável à ocupação de novos ambientes (SCARANO *et al.*, 2004). Curiosamente, a restinga do PNRJ apresenta, dentre suas espécies dominantes, uma elevada proporção de plantas dióicas (36 % das espécies mais importantes, MATAALLANA *et al.*, 2005) que, obrigatoriamente, requerem polinização cruzada para a reprodução sexual (BAWA e OPLER, 1975; FREEMAN *et al.*, 1997; THOMPSON e BARRET, 1981). Isto levou MATAALLANA *et al.* (2005) a propor que a colonização da restinga possa ter sido beneficiada por mecanismos de reprodução clonal. A importância da reprodução vegetativa ainda é reforçada pela baixa taxa de recrutamento de plântulas e de germinação de sementes em solos de restinga (CORREIA, 1998; ZALUAR e SCARANO, 2000). Além disso, a propagação vegetativa é uma característica comum a plantas de restinga (CIRNE e SCARANO, 2001), incluindo *C. hilariana* (SCARANO *et al.*, 2004).

A perspectiva da reprodução vegetativa promover a redução da diversidade genética e, conseqüentemente, aumentar a vulnerabilidade da espécie frente a mudanças ambientais (FARIA *et al.*, 2006; SCARANO, 2002), torna o caso de *C. hilariana*

particularmente relevante de ser estudado, dada a importância funcional desta espécie no sistema (ARAUJO, 2004; DIAS *et al.*, 2005, 2006; SCARANO, 2002, DIAS e SCARANO, 2007). A descrição de fracasso na polinização em *C. hilariana* deu peso à hipótese da alta importância da reprodução vegetativa na colonização das áreas de restinga por esta espécie (FARIA *et al.*, 2006).

Populações formadas a partir de propagação vegetativa tendem a promover a estruturação dos genótipos (VEKEMANS e HARDY, 2004). Conforme apresentado na *Primeira parte – Introdução Geral*, estudos prévios com marcadores moleculares do tipo microssatélites em *C. hilariana* revelaram uma baixa diversidade de alelos. Curiosamente, o sítio amostral com maior diversidade genética apresentou plantas masculinas com flores vermelhas e com flores brancas, visualmente formando agrupamentos distintos e segregados na paisagem. Indivíduos masculinos e femininos também formam grupos aparentemente separados. A formação de agrupamentos e a consistência da expressão sexual ao longo dos anos (ver *Capítulo 2 - Segunda Parte*) sugerem que clones mantenham o mesmo sexo de forma que a agregação dos gêneros e dos morfotipos estaria de acordo com a hipótese de que as populações sejam geneticamente estruturadas pela reprodução clonal.

Em função de avaliar a importância do crescimento e da reprodução vegetativa na constituição das populações de *C. hilariana*, o presente trabalho usou o polimorfismo obtido com base na amplificação de fragmentos de DNA de tamanhos diferentes (AFLP) para estudar a estruturação genética do sítio amostral de maior diversidade genética, conforme dados obtidos no ensaio com marcadores microssatélites. Essa área de maior diversidade genética apresenta os diferentes sexos e distintos morfotipos florais dispostos, visualmente, de forma agregada, conforme o esperado, caso *C. hilariana* apresente propagação vegetativa.

1.2. Material e Métodos

Sítio amostrado

A similaridade genética foi avaliada em um dos sítios amostrais mais continentais do PNRJ, entre as lagoas Comprida e Cabiúnas (sítio amostral 6 – figura 0.3.B da *Primeira Parte – Introdução Geral*). O estudo considerou todas as plantas em uma área de 90 x 90 m, que incluiu 45 plantas, previamente mapeadas em um plano bidimensional X (norte-sul) Y (leste– oeste). Os indivíduos foram definidos com base na expressão sexual, no padrão de coloração das flores, na ligação visível entre galhos no tronco e/ou pela convergência de ramos para um ponto abaixo da superfície do solo. A área incluía: (a) 19 plantas masculinas com flores brancas (grupo masculino branco), (b) 13 plantas que não floresceram nos anos de 2003 e 2004 (estéreis), (c) 7 plantas femininas (grupo feminino) e (d) 6 plantas masculinas com flores vermelhas (grupo masculino vermelho).

Apenas folhas novas foram coletadas a partir de um único ramo da planta na tentativa de evitar a amplificação de DNA exógeno. Aproximadamente cinco folhas de cada planta foram arrancadas e armazenadas em frascos de 50 ml contendo sílica gel, por um período inferior a cinco dias. No laboratório, as folhas foram transferidas para um freezer a -80 °C, onde ficaram estocadas por um período inferior a 10 meses, até a extração do DNA.

Padrão de distribuição espacial dos indivíduos

A análise da distribuição espacial foi feita para cada grupo, por meio do Índice de Morisita (*I_d*) (MORISITA, 1959) e Índice de Morisita Padronizado (*I_p*) (KREBS, 1999). A

agregação foi calculada para três diferentes escalas espaciais: 8 quadrantes de 22,5x22,5 m, 6 quadrantes de 30x30 m e 4 quadrantes de 45x45 m. O Índice de distribuição de Morisita é definido como:

$$I_d = \frac{n[\sum x_i^2 - \sum x_i]}{(\sum x_i)^2 - \sum x_i}$$

onde n é o número de quadrantes e x_i é o número de indivíduos no i ésimo quadrante. O Índice de Morisita é uma variável aleatória de forma que, se os indivíduos estiverem distribuídos aleatoriamente nos quadrantes, o valor de I_d será igual a 1. Valores de $I_d > 1$ indicam um padrão agregado e valores de $I_d < 1$ indicam um padrão de distribuição uniforme.

No Índice de Morisita Padronizado a padronização considera a adesão ao padrão aleatório em um intervalo de confiança de 95 % (teste de qui-quadrado). Valores superiores a 0,5 indicam que o grau de agregação é significativamente diferente do padrão aleatório e valores inferiores a -0,5 indicam que o grau de uniformidade da distribuição é significativamente diferente do padrão aleatório (TSUJI e TSUJI, 1998). O cálculo do Índice de Morisita Padronizado considerou a relação entre três parâmetros I_d , Mu e Ma (ver KREBS, 1999 para mais informações), sendo Mu o valor crítico para a distribuição uniforme,

$$Mu = \frac{\chi_{0,975}^2 - n = \sum x_i}{(\sum x_i) - 1}$$

($\chi_{0,975}^2$ = valor de qui-quadrado com $(n-1)$ graus de liberdade à $\alpha = 0.975$, x_i = número de indivíduos no i ésimo quadrado), e Ma o valor crítico para distribuição agregada,

$$Ma = \frac{\chi^2_{0,025} - n = \sum x_i}{(\sum x_i) - 1}$$

($\chi^2_{0,025}$ = valor de qui-quadrado com $(n-1)$ graus de liberdade à $\alpha = 0.25$, x_i = número de indivíduos no i ésimo quadrado). O Índice de Morisita Padronizado é considerado uma das melhores medidas de dispersão baseada em quadrantes, pois é pouco sensível a variações no tamanho do quadrado e independente da densidade populacional da amostra (MYERS, 1978; UPTON e FINGLETON, 1985).

Extração do DNA

Para extração do DNA genômico das amostras de *C. hilariana*, foi utilizado o protocolo baseado no uso do detergente CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987). Aproximadamente 150 mg de tecido foliar congelado foi macerado em nitrogênio líquido até produzir um pó fino, sobre o qual foi adicionado 900 μ L de tampão de extração (2 % de CTAB; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA; 200 mM de Tris-HCL; 2 % de PVP; pH 8,0; 0,4 % de β -mercaptoetanol). A mistura foi vigorosamente agitada em um vórtex por 30 segundos e incubada a 65°C por 1 hora, sendo agitada por inversão a cada 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 700 μ L de clorofórmio-alcoolisoamílico (24:1). A mistura foi agitada por inversão durante 5 minutos e centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente. A fase aquosa, superior, foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado 1/10 do volume de uma solução de 10 % de CTAB, 1,4 M de NaCl. A mistura passou por mais três processos de limpeza com clorofórmio-alcoolisoamílico, até a obtenção de uma fase aquosa translúcida. Ao final da terceira lavagem, a fase aquosa foi transferida para um outro tubo onde foi adicionado 2/3 do volume de solução (aproximadamente 400 μ L) de isopropanol frio (-20 °C), e misturada por inversão para a precipitação do DNA. A mistura foi incubada por 16 horas a 4 °C para, posteriormente, ser

centrifugada a 13.000 rpm por 20 minutos. A fase aquosa foi dispensada e o precipitado de DNA foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70 %, por 5 minutos, e uma vez com etanol 100 %, por mais 5 minutos. Após as lavagens, o precipitado foi seco a temperatura ambiente. A massa seca de DNA obtida ao final da secagem foi dissolvida em 50–100 µl de água Milli Q[®] (filtrada no aparelho Ultra Pure Water System da Milli Q[®] e esterilizada em autoclave a 1,5 atm de pressão a 120 °C por 15 minutos) contendo 10 µg/ mL de RNase. A solução de DNA final foi deixada em temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) por 30 minutos e posteriormente armazenada em *freezer* a - 20 °C.

Quantificação do DNA

A concentração e a integridade do DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose 0,8 % a TAE 1x (Tris Base 24,3 g/L; ácido acético glacial 5,7 (P/V); EDTA 10 %; pH 8,0) e 12 µL/100 mL de tampão de brometo de etídeo. Em 2 µL de cada amostra foi adicionada 1 µL de tampão (0,025 % de azul de bromofenol, 0,25 % de xilenocianol FF e 30 % de glicerol em água) e mais 8 µL de água Milli Q[®]. As amostras foram aplicadas no gel e a migração eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100 V. Após 10 minutos de migração eletroforética, o DNA foi observado em um transiluminador de luz ultravioleta e a imagem digitalizada e fotografada (sistema EagleEye – Stratagene[®]). O DNA extraído foi comparado com DNA padrão, com massa molecular conhecida, contendo 25, 50, 100 e 200 ng do fago λ.

Reações de AFLP

A partir do estoque de DNA quantificado as amostras foram analisadas quanto ao polimorfismo de bandas obtido por meio de marcadores do tipo AFLP (VOS *et al.*, 1995). O polimorfismo foi obtido com base em oito combinações de iniciadores: *Eco* - CA x *Mse* -

GCAC; *Eco* - CC x *Mse* - GCAC; *Eco* - CG x *Mse* - GCAC; *Eco* - CT x *Mse* - GCAC e *Eco* - CA x *Mse* - GACC; *Eco* - CC x *Mse* - GACC; *Eco* - CG x *Mse* - GACC; *Eco* - CT x *Mse* - GACC.

Inicialmente 15 ng do DNA genômico foram digeridos com *Eco* RI e *Mse* I. A digestão ocorreu por 12 horas a 37 °C em um volume de 10 µL contendo: 0,5 U de *Eco* RI, 0,5 U de *Mse* I e 2,0 µL do tampão de reação 5x (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM de acetato de magnésio e 250 mM de acetato de potássio).

Após a digestão, os fragmentos foram ligados a adaptadores complementares aos sítios de clivagens. Foram utilizados 5 pmol de cada um dos adaptadores relacionados aos sítios de clivagem *Eco* RI e *Mse* I, e 0,2 µL de T4 DNA ligase. A reação foi realizada num volume final de 5 µL incubada à 20°C por 3 horas. Em seguida, a reação foi diluída na razão de 1:4, ou seja, para 15 µL de solução, foram adicionados 45 µL de TE, em um volume final de 60 µL.

A pré-amplificação seletiva dos fragmentos ligados aos adaptadores foi feita em um volume de 20 µL de uma solução de: 5 µL do DNA digerido e ligado ao adaptador; 1 µL do iniciador *Eco* (5'AGA CTG CGT ACC AAT TC 3') + nucleotídeo seletivo C (50 ng/ µL); 1 µL do iniciador *Mse* (5'GAA CGA TGA GTC CTG AGT AA 3') + nucleotídeo seletivo G (50 ng/ µL); 1 µL de dNTP (5 mM); 2 µL do tampão 10 X PCR (500 mM; 100 mM Tris-HCl, pH 8,3); 1 µL de MgCl₂ (50 mM); 0,1 µL de *Taq* DNA polimerase (50 U/ µL) e 9,5 de H₂O ultrapura. A pré-amplificação foi feita em um termociclador nas seguintes condições: 94°C por 30 segundos; seguido por 65°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Estas etapas são repetidas 13 vezes com um decréscimo na temperatura da segunda etapa de 0,7°C por repetição, indo de 65°C até 56°C. Ao final das repetições descritas acima,

segue-se uma fase com 3 ciclos, (1) 94°C por 30 segundos; (2) 56°C por 30 segundos e (3) 72°C por 60 segundos, que são repetidos 23 vezes.

Na última seleção de fragmentos foram utilizados iniciadores *Eco* marcados, na porção terminal, com fluorocromos (Invitrogen®) em combinação com iniciadores *Mse* não marcados. Iniciadores *Eco* + oligos CA e *Eco* + oligos CG foram marcados em porções terminais com fluorocromos fam (6-carboxifluoresceína), enquanto os iniciadores *Eco* + oligos CC e *Eco* + oligos CT foram marcados em porções terminais com fluorocromos hex (hexaclorofluoresceína). As reações de amplificação finais combinaram um *Mse* + 3 oligos com dois *Eco* + 2 oligos marcados com fluorocromo, em reações do tipo “multiplex”. As amplificações finais foram feitas em um volume final de 15 µL, contendo: 2 µL do tampão 10 X PCR; 0,05 µL da enzima *Taq* DNA polimerase (5U/ µL); 0,02 µL de *Eco* + 2 oligos + fam (100 µM); 0,02 µL de *Eco* + 2 oligos + hex (100 µM); 0,04 µL de *Mse* + 3 oligos (100 µM); 0,4 µL de dNTP (5 mM); 1,2 µL de MgCl₂ (50 mM) e 11,27 de H₂O ultrapura. Os ciclos térmicos seguiram o mesmo padrão da pré-amplificação. Ao final da amplificação foi acrescentado 0,6 µL de marcador de peso molecular, de 35 a 500 pb (GeneScan™ – 500 LIZ® Size Standard), e 13,6 µL de tampão contendo: 98 % de formamida, 10 mM EDTA pH 8,0 e 0,1 % de azul de bromofenol e xilenocianol.

Dados de AFLP

Apesar da alta quantidade de fragmentos obtidos por DNA genômico total via técnica de AFLP dificultar a replicabilidade dos estudos que consideram esse polimorfismo, a técnica tem se mostrado eficiente na comparação do grau semelhança genética entre pares de indivíduos que estão dispostos a diferentes distâncias, aproximando-se da eficiência dos marcadores codominantes, principalmente quando a

análise desconsidera *loci* raros e muito comuns, que podem ser artefatos da técnica (KREMER *et al.*, 2005; LYNCH e MILLIGAN, 1994).

A análise do polimorfismo de AFLP em *C. hilariana* também é amparada pelo fato desta espécie não apresentar poliploidia ($2n = 60$ em todas as espécies estudadas por CRUZ *et al.*, 1990, incluindo *C. hilariana*), pois em organismos poliplóides o polimorfismo pode ser ampliado pela quantidade de material genômico.

O tamanho dos fragmentos amplificados foi analisado por meio de eletroforese em capilares em um seqüenciador automático, ABI Prism Gene Mapper[®] (Applied Biosystem). Os fragmentos fluorescentes foram lidos como picos em um eletroferograma, sendo que a ordem dos picos corresponde aos tamanhos dos fragmentos amplificados. A amplificação em uma mesma reação de iniciadores *Eco* marcados com fluorocromos diferentes resultou em dois padrões de picos diferentes. Os picos produzidos pelos fragmentos foram convertidos em algoritmos pelo programa ABI Prism Gene Mapper Software Version 3.0 (Applied Biosystems). Cada pico gerado por um fragmento (banda) foi considerado um *loco*. Foi atribuído o valor “1” (presença do alelo) para os indivíduos que apresentaram o pico de determinado tamanho e “0” (ausência do alelo) para os indivíduos que não apresentaram o pico para o tamanho considerado. As matrizes binárias de presença e ausência foram transferidas para uma planilha comum a outros programas de análises genéticas.

Análise dos dados

Devido à natureza dominante dos marcadores AFLP todas as análises assumiram que os *loci* atendem ao equilíbrio de Hardy–Weinberg. Das 45 plantas amostradas apenas um planta masculina com flores brancas (planta 01) não apresentou reação positiva para

as combinações de iniciadores. Para todas as análises foram considerados somente os *loci* com frequência superior a 10 % e inferior a 95%, evitando a influência de polimorfismos produzidos de maneira artificial, o que é inerente à técnica de AFLP (LYNCH e MILLIGAN, 1994).

A distância genética (D) e a identidade genética (I) ($I = -\ln D$) de NEI (1978), foram feneticamente calculadas pelo programa MEGA versão 3.1 (KUMAR *et al.*, 2004). Os dados fenéticos também foram analisados por análise de componente principal (PCA) e os indivíduos foram organizados em função das distâncias genéticas Nei-Gojobori, que considera o número de diferenças entre os indivíduos (KUMAR *et al.*, 2004). A organização no dendrograma ocorreu par a par e os nós foram estabelecidos conforme as distâncias médias entre indivíduos (conforme UPGMA).

As distâncias genéticas Nei-Gojobori inter- e intragrupos também foram calculadas pelo programa MEGA. Os grupos foram organizados em um dendrograma por UPGMA, pelo programa TFPGA versão 1.3 (MILLER, 1997), considerando as distâncias genéticas de Nei (D) entre os mesmos. O cálculo das distâncias entre os nós, que relacionam os diferentes grupos, considerou os valores médios obtidos por 1000 “bootstraps”. O teste de Mantel foi utilizado para verificar se as diferenças genéticas entre os grupos considerados foram significativas.

A estrutura genética espacial foi avaliada por meio do programa SGS “Spatial Genetic Software” (DEGEN *et al.*, 2001). O programa calcula a distância espacial entre os indivíduos amostrados e os agrupam em classes de distância euclidiana. As distâncias são calculadas pela localização das plantas no plano bidimensional. A análise considera a distância genética Tanimoto dos indivíduos em diferentes intervalos de distância espacial. O teste de permutação de Monte Carlo calcula os desvios da distribuição aleatória de

genótipos com intervalo de 95 % de confiança. Cada permutação consiste em uma substituição randômica de dados genéticos de diferentes indivíduos da população amostrada para uma determinada coordenada. A distribuição nula foi obtida após 1000 permutações. O desvio das distâncias genéticas observadas com relação à distribuição nula obtida é feito para cada intervalo de distância espacial, considerando o número de pares de indivíduos em cada intervalo. Os dados são apresentados em um distograma com a distância genética Tanimoto e os limites de significância para cada intervalo de distância espacial. Foram considerados 18 intervalos de distância múltiplos de 5m, considerando pares de indivíduos distantes 5 m, no menor intervalo de distância espacial, e 90 m, no maior intervalo de distância espacial. Um número mínimo de 30 pares de indivíduos por intervalo de distância espacial é recomendado, para que as análises sejam precisas (CAVERS *et al.*, 2005).

Conforme CAVERS *et al.* (2005), o SGS pode ser utilizado para estimar a estruturação genética de poucos indivíduos, desde que o número de *loci* utilizados seja expressivo. Estes autores consideraram 100 *loci* suficientes para avaliar a estrutura espacial de 175 indivíduos de *Symphonia globulifera* L.f. (Clusiaceae). No presente trabalho, a estruturação genética das 44 plantas foi avaliada por meio de 401 *loci*, desconsiderando *loci* raros e comuns.

1.3. Resultados

Padrão de distribuição espacial

O Índice de Morisista (*I_d*) e o Índice de Morisita Padronizado (*I_p*) indicaram um padrão de distribuição agregado para o grupo das plantas com flores masculinas

vermelhas, nas escalas de 22,5 x 22,5 m e 30 x 30 m. O índice de Morisita Padronizado detectou padrões aleatórios de distribuição para todos os outros grupos considerados (Figura 1.1.), embora as fêmeas também tenham se apresentado relativamente agregadas, conforme apresentado pelo índice de Morisita (Figura 1.2.).

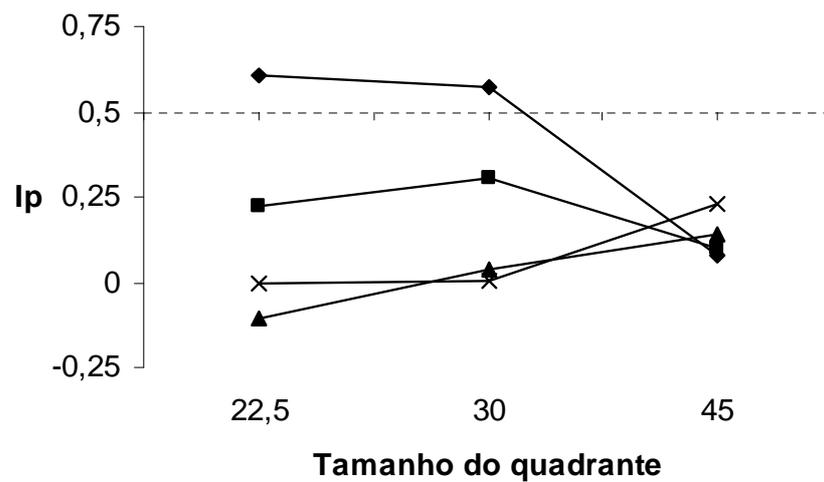


Figura 1.1. Variação nos valores do Índice de Morisita Padronizado (I_p) para os grupos de (◆) plantas masculinas com flores vermelhas, (■) plantas femininas, (X) plantas que não floresceram nos anos de 2003 e 2004 e (▲) plantas masculinas com flores brancas, em diferentes tamanhos de quadrante considerados. A linha pontilhada representa os limites de significância para os valores de Morisita, conforme teste de qui-quadrado.

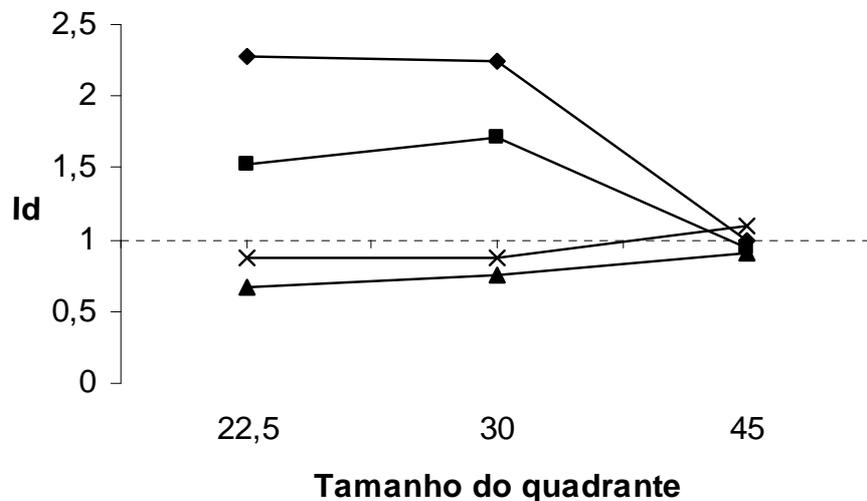


Figura 1.2. Variação dos valores do Índice de Morisita (I_d) para os grupos de (◆) plantas masculinas com flores vermelhas, (■) plantas femininas, (X) plantas que não floresceram nos anos de 2003 e 2004 e (▲) plantas masculinas com flores brancas, em diferentes tamanhos de quadrante considerados. Valores superiores a 1 sugerem que as plantas estão distribuídas de maneira agregada, enquanto valores inferiores a 1 sugerem que as plantas estão distribuídas de maneira aleatória.

Polimorfismo detectado por AFLP

O polimorfismo obtido com base no tamanho dos fragmentos, por meio de oito combinações de iniciadores (Eco + 4 * Mse + 2), produziu 925 *loci*. Porém, considerando apenas os *loci* com frequência inferior a 10 % e superior a 95 %, apenas 43,4 % dos *loci* foram utilizados na análise (401 *loci*).

Análise de agrupamentos conforme polimorfismo obtido por AFLP

O dendrograma relacionando os 44 indivíduos amplificados com base na distância genética Nei-Gojobori, apresentou dois grupos de indivíduos masculinos com flores brancas (grupo dos indivíduos 40, 26, 22 e 02 e grupo dos indivíduos 19, 34, 35 e 27), no entanto as plantas relacionadas estão espacialmente distantes (Figura 1.3.A, B). A distância genética de Nei (D) foi em média 0,47 (\pm 0,02) na população. A identidade genética de Nei (I) foi 0,75. As distâncias genéticas Nei-Gojobori entre plantas de um mesmo grupo e entre plantas de outros grupos apresentaram valores próximos (Tabela 1.1) e os grupos considerados não diferiram significativamente, conforme o teste de Mantel realizado pelo programa TFPGA. O dendrograma relacionando os grupos conforme a distância genética D , corroborou os dados de distância genética calculada pelo programa MEGA (Figura 1.4).

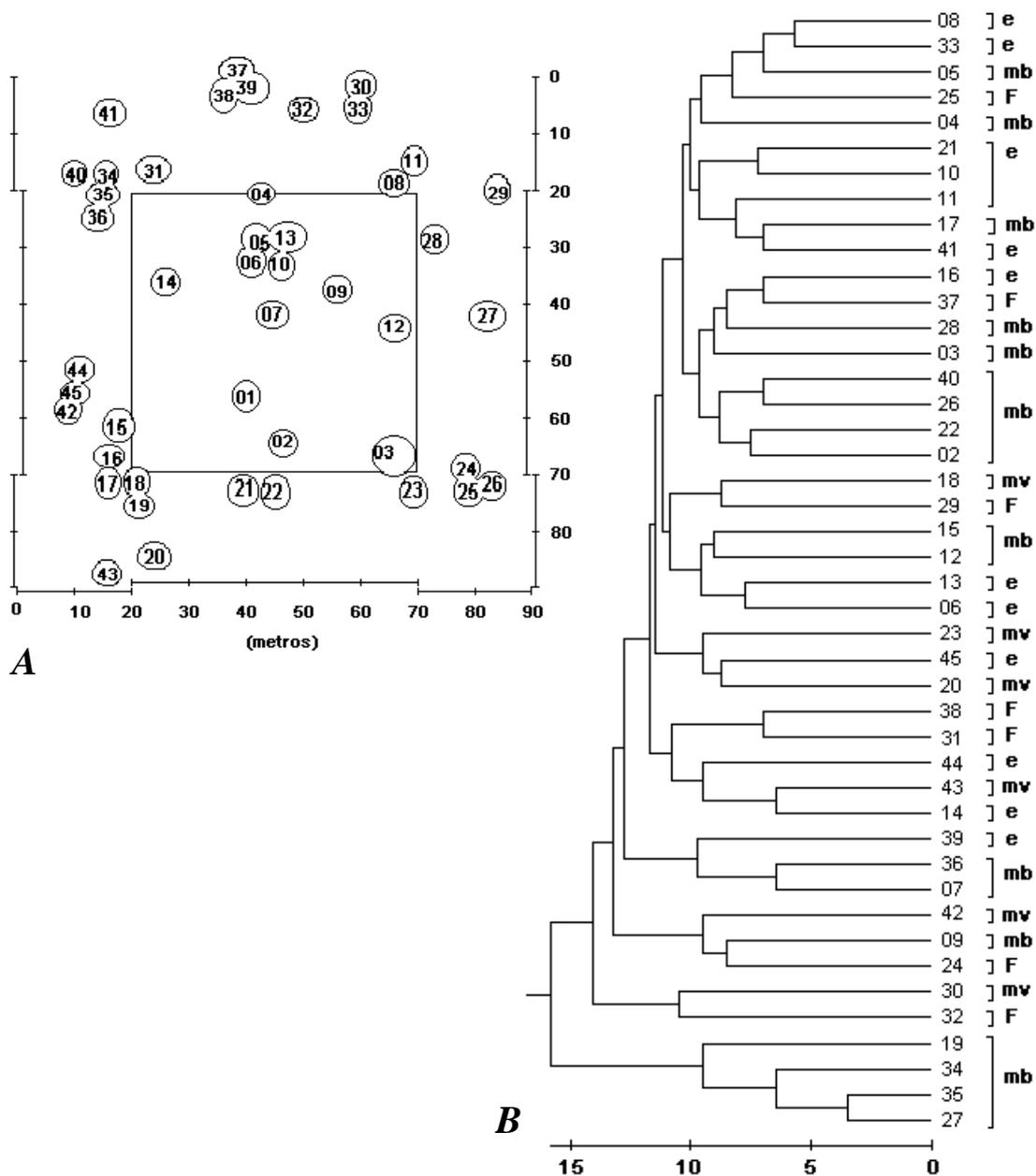


Figura 1.3. A) Mapa esquemático da área de amostragem das 44 plantas de *Clusia hilariana* Schtdl., do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. B) Dendrograma gerado por UPGMA com base nas distâncias genéticas (Nei-Gojobori) entre as plantas da área de estudo. As plantas foram classificadas por letras maiúsculas conforme os grupos considerados no estudo: (mb) plantas masculinas com flores brancas, (e) Plantas que não floresceram nos anos de 2003 e 2004, (mv) plantas masculinas com flores vermelhas e (F) plantas femininas.

Tabela 1.1. Porcentagem de *loci* polimórficos, *He* (heterozigosidade média esperada por subpopulação) e distâncias genéticas Nei-Gojobori (número de diferenças) intra- e intergrupos de plantas de *Clusia hilariana* Schltl.. Os grupos foram definidos como: plantas masculinas com flores vermelhas, plantas femininas, plantas masculinas com flores brancas e plantas que não floresceram nos anos de 2003 e 2004. As distâncias foram calculadas por meio do programa MEGA versão 3.1 (KUMAR *et al.*, 2004), com base em polimorfismo de bandas de AFLP, gerados por oito combinações de iniciadores *Eco* e *Mse*.

	% de <i>loci</i> polimórficos	<i>He</i> médio	Distância genética intra-grupo (\pm erro padrão)	Distância genética intergrupo (\pm erro padrão)		
				Fêmeas	Masculinas - flores vermelhas	Plantas que não floresceram
Fêmeas	64,58	0,22	24,71 (\pm 2,24)	-		
Masculinas – flores vermelhas	73,56	0,26	25,77 (\pm 2,18)	25,42 (\pm 1,86)	-	
Plantas que não floresceram	73,06	0,27	21,03 (\pm 1,87)	24,12 (\pm 1,76)	24,15 (\pm 1,85)	-
Masculinas - flores brancas	99,25	0,34	24,24 (\pm 1,42)	26,94 (\pm 1,60)	27,89 (\pm 1,76)	24,04 (\pm 1,49)
Total	100	0,33	-	-	-	-

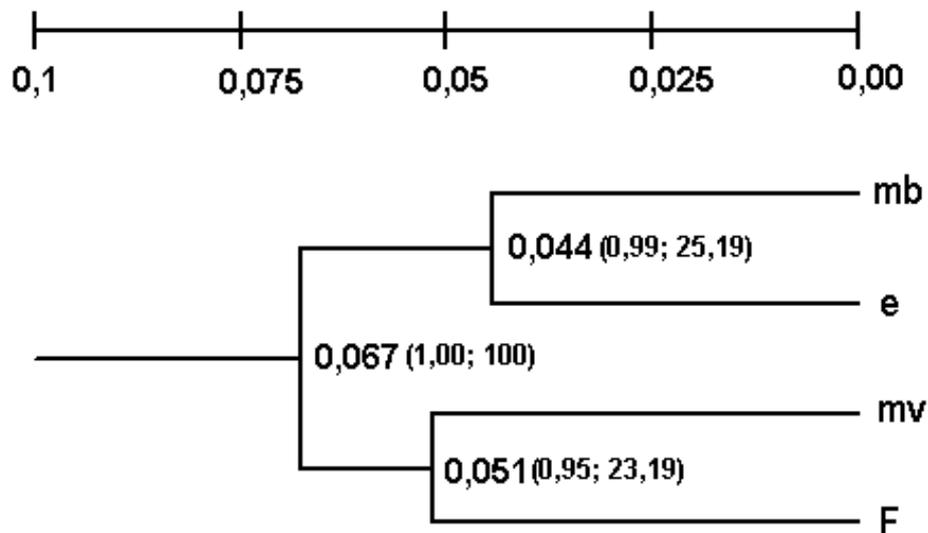


Figura 1.4. Dendrograma gerado por UPGMA com base nas distâncias genéticas entre os grupos de *Clusia hilariana* Schlttdl.: (mb) plantas masculinas com flores brancas, (e) plantas que não floresceram nos anos de 2003 e 2004, (mv) plantas masculinas com flores brancas e (F) plantas femininas. Valores entre parênteses representam a proporção de replicatas que apresentaram o respectivo nó em 1000 “bootstraps” e a porcentagem de *loci* que suportam cada nó.

Estrutura genética

O distograma produzido pelo programa SGS apresentou pequenas variações no valor médio da distância genética das árvores relacionadas par-a-par nas diferentes escalas (Figura 1.5). Os valores médios observados ficaram dentro do esperado para uma distribuição de genótipo de maneira aleatória, para todos os intervalos de distância avaliados. Nas escalas espaciais de 65, 80, 85 e 90 m não foi obtido um número mínimo

de pares ($N > 30$) que permitissem a obtenção de valores confiáveis para o teste de Monte Carlo (Figura 1.6).

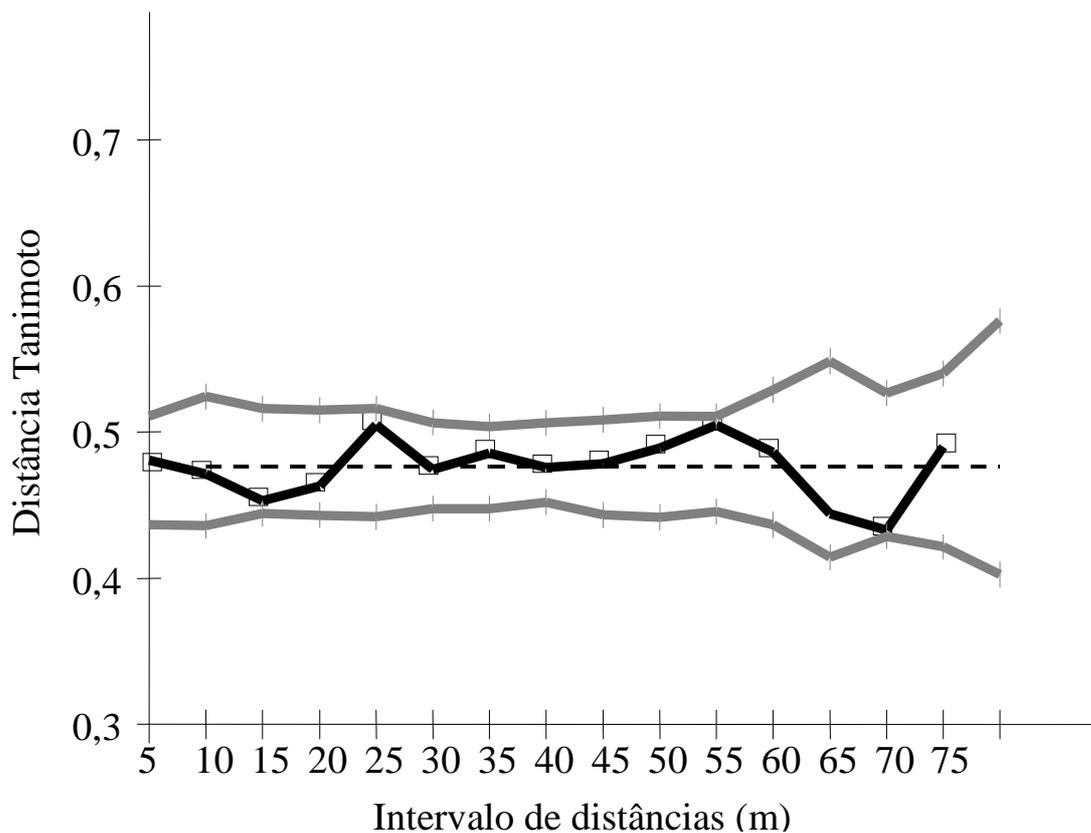


Figura 1.5. Variação das médias das distâncias Tanimoto entre as plantas de *Clusia hilariana* Schltdl., considerando as diferentes escalas espaciais consideradas (linha contínua na cor preta). Linhas em cinza representam os intervalos de confiança de 95 %, obtida por meio de 1000 permutações aleatórias que produziram distribuições nulas, relativa à ausência de estruturação genética nas diferentes escalas. O intervalo de 65 metros não apresentou o número de 30 pares de indivíduos, sendo o teste de Monte Carlo pouco confiável para este intervalo de distância.

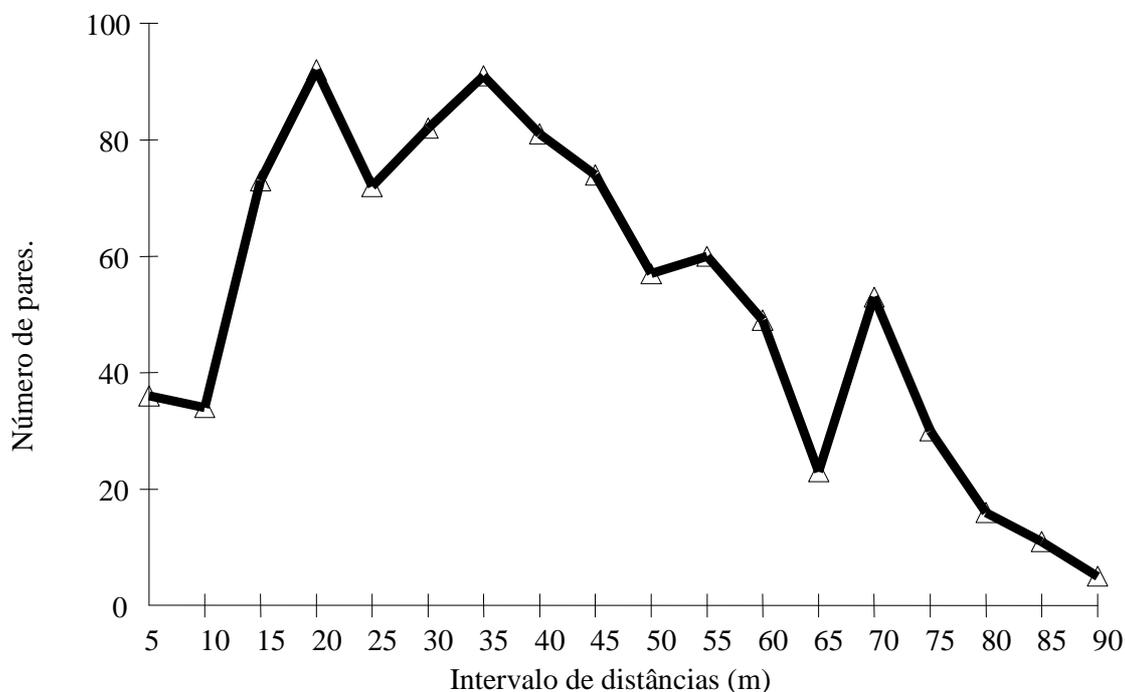


Figura 1.6. Número de pares de plantas de *Clusia hilariana* Schltdl. por intervalo de distância na área do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Macaé, Rio de Janeiro.

1.4. Discussão

Não houve indícios de conectividade entre plantas de *Clusia hilariana* da área estudada, considerando indivíduos distantes até cinco metros, o que sugere ausência de clonalidade. Os valores de distância genética média dos pares de indivíduos de todos os intervalos de distância considerados não diferiram significativamente do esperado para uma distribuição aleatória. Porém, os limites de significância foram calculados em uma distribuição normal, criada com base na substituição dos pares comparados por outros fenótipos da mesma população. Esse resultado não descarta a possibilidade de

indivíduos de uma determinada localidade serem geneticamente mais próximos entre si do que populações de outras áreas (ver *Capítulo 4 - Segunda Parte*).

Grupos baseados na morfologia de flores e no sexo não foram consistentes geneticamente, apesar das plantas masculinas vermelhas e plantas femininas estarem espacialmente agregadas. O padrão agregado de fenótipos foi um critério utilizado para a escolha da área de estudo, de forma que a ausência de estruturação genética nesta área, com morfotipos espacialmente agregados, reforça a não ocorrência de propagação vegetativa na espécie.

A ausência de registros de clones pode estar relacionada aos critérios adotados na amostragem, que considerou plantas distantes mais de 5 m. Neste contexto, a propagação vegetativa pode estar ocorrendo em pequenas escalas espaciais, em conformidade com o estudo de CORREIA (1998) que determinou que 28 % das plantas de *C. hilariana* com menos de 50 cm ($n = 59$) resultam de propagação vegetativa. Este fato é reforçado pela estrutura de crescimento de plantas de *C. hilariana*, com galhos emergindo de um ponto central abaixo do solo.

Uma propagação vegetativa em pequenas escalas espaciais tem pequena importância na colonização de ambientes, que somado com a ausência de agamospermia (conforme FARIA *et al.*, 2006), coloca a reprodução sexuada como o processo mais importante na ocupação das áreas de restinga por *C. hilariana*. Segundo McLAUGHLIN e FRIAR (2007), a capacidade de ocupação de áreas por meio de propagação vegetativa é resultado do tipo de arquitetura que a planta apresenta na propagação em módulos. Módulos de um mesmo genótipo podem estar ligados por raízes extensas e uma população pode ser formada por redes de módulos de genótipos distintos que se sobrepõem, diminuindo a estruturação genética de uma população (McLAUGHLIN e

FRIAR, 2007). Desta forma, apesar de *C. hilariana* aparentemente apresentar propagação vegetativa por pequenas distâncias, dados mais precisos sobre a estratégia de crescimento modular só podem ser obtidos por meio da visualização das conexões após a escavação e identificação de raízes.

A propagação vegetativa favorece a preservação temporal de genótipos (LAMBERGE *et al.*, 2000), o aumento da área fotossintética e o aumento da produção de flores e frutos dos genótipos, por evento reprodutivo (JANZEN, 1975; METCALFE *et al.*, 1986). A persistência dos genótipos via propagação vegetativa pode ter permitido um aumento gradual da dominância da espécie e, conseqüentemente, um aumento da diversidade genotípica mesmo sob baixas taxas de recrutamento nas áreas de restinga (ZALUAR e SCARANO, 2000). Dessa forma, os dados permitem levantar a hipótese que a abundância local de *C. hilariana* tenha sido alcançada pela combinação de sucesso reprodutivo em anos com alta taxa de recrutamento e uma manutenção efetiva dos genótipos via propagação vegetativa.

As dificuldades de germinação de *C. hilariana*, dependente da associação com bromélias-tanque (SAMPAIO *et al.*, 2005; SCARANO, 2002; SCARANO *et al.*, 2004), pode favorecer o recrutamento de sementes de genótipos não relacionados em uma mesma área, o que aumenta a diversidade genotípica em áreas espacialmente reduzidas. Considerando que a polinização de *C. hilariana* está na dependência das visitas de pequenas abelhas Augochlorini (MARTINS *et al.*, 2007), que promovem um limitado fluxo de pólen (BAWA e OPLER, 1975), a dispersão pode ser considerada o principal fator no aumento de diversidade genética, garantindo a continuidade das populações de *C. hilariana* (ver EPPERSON e ALVAREZ-BUYLLA, 1997; HAMRICK *et al.*, 1992, 1993).

As questões relacionadas à polinização de *C. hilariana* são exploradas em profundidade nos capítulos subseqüentes, sugerindo que os padrões de floração das plantas afetam o fluxo de pólen entre plantas, tendo um importante efeito na variabilidade genética.

Capítulo 2

Automimetismo floral em *Clusia hilariana* Schtdl. (Clusiaceae)

2.1. Introdução

A polinização por mimetismo floral se dá quando plantas utilizam falsos atrativos para atração de polinizadores (WIENS, 1978). LITTLE (1983) distingue quatro tipos de mimetismo floral: (1) polinização por engano, quando os falsos atrativos simulam flores com recursos florais, (2) pseudo-antagonismo, quando os atrativos induzem a defesa do território pelo visitante floral, (3) pseudocopulação, quando os falsos atrativos imitam características sexuais dos visitantes florais e (4) mimetismo com base na imitação de presas e alimentos dos visitantes florais. A polinização por engano, o tipo (1) acima descrito, está relacionada a três casos de mimetismo, conhecidos como: mimetismo interespecífico (“two taxa deceit mimics”), mimetismo com base na inexperiência de polinizadores juvenis (“mimicry based on naiveté”) e automimetismo floral (LITTLE, 1983). Automimetismo ou mimetismo Broweriano é um tipo de mimetismo Batesiano intra-específico aplicável quando modelos e mímicos são diferentes indivíduos da mesma espécie, o que pode ser definido como mimetismo intraespecífico (DAFNI, 1984; LITTLE, 1983). Esse processo é próprio de sistemas dióicos nos quais as flores masculinas com recurso são mimetizadas por flores femininas, de forma que a reprodução cruzada ocorre na ausência de recurso. BAKER (1976) foi um dos primeiros a descrever o processo, enquanto estudava o sistema sexual de *Carica papaya* L.

Existem poucos estudos de automimetismo para o gênero *Clusia* (MARTINS *et al.*, 2007). Apesar disso o gênero apresenta casos bem documentados de automimetismo, como o de *C. criuva* Camb. (CORREIA *et al.*, 1993), e outros casos em que as visitas de alguns grupos de abelhas são descritas como polinização por engano, como em *C. insignis* Sem. e *C. pusilla* Steyerem. (BITTRICH e AMARAL, 1996a e 1997). A descrição dos eventos de polinização por engano está relacionada à ocorrência de visitas, sem coleta de recursos, porém o automimetismo nem sempre é assumido para a espécie de planta que é visitada por engano, devido à presença de resina nas flores miméticas. Conforme discutido por MARTINS *et al.* (2007), a quantidade de visitas de abelhas que ignoram a presença de resina nas flores de *C. hilariana* sugere que a polinização por engano também pode ser importante para a reprodução desta espécie de restinga, conforme adotado por STEINER (1998) para orquideas que produzem recursos pouco importantes para a visita. Nesse contexto, a presença de resina pode ser explicada como um engodo utilizado para a atração de alguns grupos de abelhas, em função do seu aspecto visual e olfativo em um modelo de automimetismo.

Em função do exposto, o presente trabalho tem como objetivo verificar a ocorrência de automimetismo em *C. hilariana* tratando especificamente da importância da similaridade entre flores masculinas e femininas e a importância da floração de plantas masculinas na promoção de visitas por engano.

2.2. Material e Métodos

Características florais

O estudo abrangeu as plantas dos nove sítios amostrais definidos na área da formação aberta de *Clusia* do entorno das lagoas de Cabiúnas e Comprida (conforme item 0.4., *Primeira parte*), no PNRJ. O levantamento foi realizado nas estações reprodutivas de 2002 - 2003 e 2003 – 2004. As observações cobriram todo o período de floração da população estudada, iniciando-se em setembro com término em janeiro do ano subsequente, evitando que algum tipo de polinizador sazonal fosse amostrado em maior frequência.

Presença de recursos, odores e padrão de cores foram registrados para flores masculinas e femininas. A abertura e as mudanças nas características das flores até a deiscência das partes florais foram anotadas em 15 flores de cada sexo. Atenção especial foi dada ao período de abertura da flor que foi acompanhado na íntegra. As variações das características florais foram registradas por meio de 6 observações periódicas durante o tempo de atividade da flor. Exsicatas de *C. hilariana* da área do estudo foram depositadas no Herbário da Universidade Federal do Rio de Janeiro (RFA – IB/UFRJ; números de registro de 31234 até 31240).

As partes florais de flores masculinas e femininas foram medidas com auxílio de um paquímetro. A receptividade do estigma foi testada em 15 flores, por meio da reação de peroxidase com H_2O_2 , conforme KEARNS e INOUE (1993). As flores foram ensacadas antes da antese e testadas apenas uma vez em diferentes momentos depois da antese. Para a verificação da ocorrência de glândulas de odor (osmóforos), 8 flores de 4 plantas de cada sexo ($n = 32$ masculinas e 32 femininas) foram mergulhadas em uma solução de vermelho neutro 1 %, por 10 min, e depois lavadas em solução de ácido acético glacial a 5 % (KEARNS e INOUE, 1993).

Visitas e visitantes florais

Os dados de visitação de flores foram obtidos a partir de 90 h de observação pela manhã (entre as 06:00 e as 09:15), 23 h ao meio-dia (entre as 10:00 e as 13:15), 23 h no final da tarde (entre 15:00 e 18:10), totalizando 136 h. Um total de 108 plantas (54 de cada sexo) foi observado. Cada planta foi observada por 75 min, por meio de 5 seções de 15 min. As seções consideravam todas as flores no campo de visão do observador, incluindo flores de primeiro, segundo e de terceiro dia. O número de flores contempladas pelo campo de visão do observador variava entre 6 e 12 flores, totalizando 421 flores masculinas (526 h/flor) e 413 flores femininas (516 h/flor). Em função do comportamento de algumas espécies (Halictinae, por exemplo) uma visita foi considerada como todos os eventos que ocorriam a partir do pouso de um visitante em uma flor até a saída do mesmo do campo focal do observador.

O comportamento dos visitantes foi avaliado, principalmente, com relação ao modo de abordar a flor, a atividade enquanto pousado e a coleta de recursos. Atenção especial foi dada ao contato do visitante com a superfície estigmática e à retirada de pólen, visando definir os eventos de visita legítima. O horário e a duração das visitas também foram registrados. Para os visitantes mais frequentes, a duração das visitas nos diferentes sexos foi comparada por meio do teste "t", considerando um número similar de visitas por sexo como repetição. Os visitantes foram registrados em dias com condições meteorológicas similares que incluíam céu aberto ou parcialmente nublado e temperatura entre 25 e 30° C. Ao final do período de observação da planta foi contabilizado o número de visitas em cada flor. Os visitantes foram fotografados durante as visitas e coletas de exemplares foram feitas apenas nos casos de dificuldade na definição da espécie visitante, ao final do período de observação. Exemplares coletados foram identificados pelo Centro de Estudos Faunísticos e Ambientais (CDZOO) do Departamento de Zoologia

da Universidade Federal do Paraná (nº de referência 1680/04) e depositados na coleção entomológica do Centro Universitário Vila Velha (UVV).

Efeito da floração de plantas masculinas sobre o sucesso feminino

Os fatores que influenciaram a taxa de produção de frutos foram avaliados para 53 plantas fêmeas que tiveram a taxa de visitação observada. Ao final do período de observação, as plantas femininas tiveram todas as flores etiquetadas. Nove dias depois da abscisão das pétalas, quando a maioria dos gineceus não fecundados já havia sido abortada, os gineceus restantes foram ensacados. Os sacos de organza eram retirados quando os frutos eram abortados ou depois da deiscência dos mesmos, por volta dos meses de março e abril do ano subsequente à floração estudada. A deiscência do fruto era contabilizada como sucesso na produção de fruto.

No mesmo dia de observação foram registradas: (a) a distância entre a planta feminina observada e a planta masculina florida mais próxima; (b) o número de flores da planta masculina florida mais próxima; e (c) a razão do número de flores femininas dividido pelo número de flores masculinas numa área de 35 metros de raio, ao redor da planta feminina observada. Esses fatores foram correlacionados com a taxa de produção de frutos na planta feminina observada, por meio de regressão múltipla.

Razão sexual de flores nas áreas

Os sítios amostrais foram visitados uma vez por semana para a determinação das plantas focais. As plantas foram acompanhadas, considerando a intensidade de floração de exemplares masculinos e femininos. As plantas focais foram definidas quando apresentavam, pelo menos, 51 % dos botões abertos.

A média diária de flores masculinas e femininas no sítio amostral, foi estimada para cada um dos sítios, no ano de 2003 (60 plantas femininas e 71 plantas masculinas). As médias de flores masculinas e femininas, expostas por localidade e por dia, foram comparadas por meio do teste t-pareado, considerando as localidades como repetições. O número de flores solitárias e em inflorescências foi avaliado considerando a flor mais nova de 80 plantas de cada sexo. As flores estavam dispostas em plantas diferentes dos sítios amostrais 4, 5 e 6.

A razão sexual de plantas masculinas e femininas sexualmente ativas foi avaliada de duas formas diferentes. Na primeira avaliação foram amostradas 7 plantas em 6 transectos de 300 m cada. Os transectos estavam dispostos paralelamente à linha da costa, no topo dos cordões arenosos. Nessa amostragem foram consideradas somente plantas adultas maiores que 3 metros de altura e 0,20 m de diâmetro ao nível da base. Na segunda avaliação foram consideradas todas as plantas masculinas e femininas de seis sítios amostrais, nos mesmos cordões arenosos onde foi feita a primeira avaliação. Em ambas avaliações as plantas foram marcadas antes do período de floração e a determinação do sexo foi feita em dois momentos diferentes durante a floração. Os resultados da primeira e da segunda avaliação foram comparados por meio do teste t-pareado, sendo cada transecto e cada localidade uma repetição.

Plantas do sítio amostral número 5 (ver Figura 0.3, *Primeira parte*), que foram sexadas em 1999 (n = 41 plantas) durante a realização do projeto de FARIA *et al.* (2006), tiveram a floração monitorada nos anos de 2001, 2003, 2004 e 2006, para verificação de mudanças na expressão sexual.

2.3. Resultados

Características florais

Flores masculinas apresentaram os estames fundidos, formando um androceu monodelfo de formato globular, cuja superfície é formada pelos poros das inúmeras anteras poricidas. Longitudinalmente o androceu apresentou um tamanho médio de 1,29 (dp = \pm 0,09) cm (n = 20). As anteras estão deiscentes desde o início da antese e permanecem disponibilizando pólen durante os três dias de atividade da flor. Caso não houvesse visitação, os grãos se acumulavam em políades o que dificulta muito a ocorrência de anemofilia. O anel de resina apresentava uma espessura média de 0,33 (dp = \pm 0,05) cm (n = 20) cobrindo toda a superfície exposta dos estaminóides. O anel de resina ao redor do androceu era visível desde o início da antese. Algumas plantas masculinas não apresentaram os tons vermelhos característicos da espécie na base das pétalas, e esse padrão foi consistente durante os anos de estudo (de 2003 a 2005). As pétalas tiveram em média 2,90 (dp = \pm 0,05) cm (n = 20). Depois do terceiro dia, as flores masculinas apresentaram os sinândrios secos e as pétalas com manchas ferrugíneas, características de oxidação. Flores com manchas ferrugíneas não receberam visita de polinizadores, independentemente da quantidade de pólen e de resina. As flores masculinas sofreram abscisão por volta do terceiro dia.

As flores femininas estavam receptivas desde o início da antese até a abscisão das pétalas, por volta do terceiro dia. O ovário é súpero e também apresenta um formato globular ornado pelos estigmas sésseis. A superfície triangular dos estigmas apresenta cores amarelo-pálido formando um anel semicontínuo no hemisfério superior do globo. O ovário e os estigmas sésseis tiveram em média 1,22 (dp = \pm 0,09) cm (n = 20) no eixo longitudinal da flor. No começo da antese, as flores femininas não apresentavam resina,

ficando evidente o anel vermelho formado pelos estaminóides na base do ovário. Quando as flores estão completamente abertas, o volume de resina é visualmente menor do que nas flores masculinas. A resina não forma um anel conspícuo como nas flores masculinas, de forma que os estaminóides são evidentes durante toda a vida da flor. Uma lâmina de resina fina e transparente cobria em média 0,19 (dp = \pm 0,05) cm (n = 20) dos estaminóides, que tiveram em média 0,43 (dp = \pm 0,06) cm (n = 20). As pétalas tiveram em média 2,81 (dp = \pm 0,09) cm (n = 20). Flores femininas de 3 dias mantêm a coloração e o formato, porém começam a perder as pétalas e escurecer a pálida superfície estigmática.

O vermelho neutro corou a parte apical dos estaminóides de flores femininas sem resina, por onde a resina era exudada. Apesar do vermelho neutro não ter evidenciado áreas de produção de odor, flores masculinas e femininas de *C. hilariana* apresentaram uma fraca fragrância de resina, próximo às partes florais.

Visitas e visitantes florais

Durante o período de observação de flores femininas, somente duas flores foram visitadas duas vezes, enquanto as flores masculinas eram visitadas aproximadamente 3 vezes (dp = \pm 8). Duas espécies de Augochlorini foram os visitantes mais comuns em flores femininas (65,3 % das visitas observadas) seguidos por *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) (23,6 %), *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (4,2 %), *Xylocopa brasiliatorum* (Linnaeus, 1767) (4,2 %) e Euglossina (2,8 %). Nas plantas masculinas os visitantes mais frequentes foram: Augochlorini (84,5 % das visitas observadas), *A. mellifera* (9,5 %), *T. spinipes* (4,2 %), *X. brasiliatorum* (1,6 %) e Euglossina (0,5 %). Eventualmente foram registradas as ocorrências de mariposas, aranhas, moscas e formigas nas flores de *C. hilariana*, mas somente as abelhas contactavam as partes reprodutivas das flores

masculinas e femininas. Durante a noite, somente moscas foram observadas nos sinândrios das flores masculinas. De maneira geral, esses visitantes não coletavam nenhum tipo de recurso, nem pólen nem resina.

Augochloropsis rothalis (Vachal, 1903) e *Augochlorella* sp. (Augochlorini) são os visitantes mais freqüentes, com um alto número de visitas por engano em flores femininas. O comportamento de Augochlorini incluía vôos erráticos ao redor da flor masculina, pousando em outras flores no campo de visão do observador, incluindo flores femininas de plantas próximas. Nas visitas, as abelhas apresentavam pólen depositado nas pernas anteriores, abdômem, tórax e antenas (ver Figura 2.1). Visitas em flores masculinas duravam em média 1 minuto, incluindo inúmeros vôos curtos ao redor da flor, pousando em pétalas e em folhas próximas à flor, onde faziam caminhadas curtas (Figura 0.1.B, *Primeira Parte*). Vôos por áreas mais extensas geralmente eram somente até flores um pouco mais distantes, que não estavam contempladas no campo focal do observador, podendo incluir até mesmo flores femininas. Algumas visitas de Augochlorini poderiam se estender por um período superior ao intervalo de tempo de uma seção de observação (15 min). Visitas em flores femininas em geral não duravam mais do que 3 segundos, tempo gasto pela abelha para inspecionar o gineceu com as pernas. Devido a duas visitas longas que duraram mais de 6 min, o tempo médio calculado para as visitas em flores femininas foi de aproximadamente 20 segundos. O tempo gasto pelos visitantes em flores masculinas e femininas foi significativamente diferente ($F_{1,38} = 12,7$; $p < 0,01$) (Figura 2.1).



Figura 2.1. Indivíduo de *Augochloropsis rotalis* (Vachal, 1903) coletando pólen em flor masculina de *Clusia hilariana* Schltld. (Clusiaceae), Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. Observe as cores ferrugíneas nas pétalas, carcterístico de flores com mais de um dia de exposição, e a espessura do anel de resina ao redor do sinândrio.

Trigona spinipes (Fabricius, 1793) coletou pólen em flores masculinas e resina em flores masculinas e femininas. As visitas em flores femininas, sem a coleta de recurso, foram consideradas visitas por engano em função do tempo das mesmas, que não ultrapassavam 5 segundos, e do fato de terem sido efetuadas por abelhas com pólen no terceiro par de pernas. As visitas em flores masculinas duravam aproximadamente 40 segundos. *Trigona spinipes* não apresentava os vôos intermitentes entre as coletas, conforme observado nas visitas de Augochlorini, apresentando visitas objetivas,

geralmente sobre uma ou duas flores na área focal de observação. Eventos de coleta de resina foram observados em uma planta de cada sexo, e duravam mais tempo do que nas visitas para coleta de pólen (Tabela 2.1; Figura 2.2). Não houve diferença significativa no tempo gasto na coleta de resina de flores masculinas e femininas ($F_{1,20} = 2,1$; $p = 0,16$).



Figura 2.2. Indivíduo de *Trigona spinipes* (Fabricius,1793) coletando resina em flor feminina de *Clusia hilariana* Schlttdl. (Clusiaceae), Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. Observe a cor avermelhada do anel de estaminóides. Foto de Izar Aximoff.

Tabela 2.1. Número de plantas e flores de *Clusia hilariana* Schtdl. observadas, número de plantas e flores visitadas, número de visitas e o tempo total das visitas de cada grupo de abelha (considerando 516 h e 15 min de observação em flores femininas e 526 h e 15 min de observação em flores masculinas).

Gênero	Plantas observadas	Flores observadas	Espécies	Recurso floral	Número de plantas visitadas pelo menos uma vez	Número de flores visitadas pelo grupo	Número total de visitas	Tempo total das visitas	
Femininas	54	415	<i>Augochloropsis rotalis</i> (Vachal, 1903)	-	25	30	33	00:10'53"	
			<i>Augochlorella</i> sp. (Augochlorini)						
			<i>Trigona spinipes</i> (Fabricius, 1793)	-	5	4	4	00:00'24"	
				Resina	1	3	12	01:31'30"	
			<i>Apis mellifera</i> (Linnaeus, 1758)	-	2	3	3	00:00'12"	
			<i>Xylocopa brasiliatorum</i> (Linnaeus, 1767)	-	2	2	3	00:00'05"	
			<i>Euglossina</i> sp.	Resina	1	4	4	00:02'20"	
Masculinas	54	437	Augochlorini	Pólen	49	153	568	10:10'32"	
			<i>T. spinipes</i>	Pólen	2	7	11	00:06'17"	
				Resina	1	3	17	01:26'55"	
			<i>A. mellifera</i>	Pólen	12	44	62	00:28'00"	
			<i>X. brasiliatorum</i>	Pólen	2	8	11	00:00'33"	
			<i>Euglossina</i> sp.	Pólen	1	3	3	00:01'31"	

Apis mellifera L. coletou, primariamente, pólen. As visitas em flores femininas foram rápidas e raras, aproximadamente 7 vezes inferior ao tempo gasto em flores masculinas (Tabela 2.1). Devido à orientação das flores, *A. mellifera* teve dificuldades para se agarrar ao androceu e iniciar a coleta de pólen (Figura 2.3). O comportamento hesitante apresentado durante o pouso nas flores masculinas, repetiu-se nas flores femininas, no entanto, após algumas tentativas e choques contra o gineceu, as abelhas desistiam do pouso. Foi registrado apenas um evento de coleta de resina, porém o registro foi feito em uma planta fora dos sítios amostrais (com um tempo estimado de 5 min e 20 segundos). Nas visitas para a coleta de resina, *A. mellifera* tocou várias vezes à superfície estigmática, enquanto estocava a resina na corbícula.



Figura 2.3. Indivíduo de *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) coletando pólen de flor masculina de *Clusia hilariana* Schltdl. (Clusiaceae), Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil.

Xylocopa brasiliatorum L. foi observada em flores masculinas e femininas de *C. hilariana*. Nas visitas as abelhas seguravam o androceu com as pernas e vibravam o corpo, conforme o comportamento conhecido como polinização por vibração (“buzz pollination”). Este comportamento era repetido em várias flores em uma seqüência (Tabela 2.1). Abelhas *X. brasiliatorum* apresentaram pólen depositado sobre todo o corpo. Na maioria das visitas em flores femininas, as abelhas apenas tocavam o gineceu com as pernas durante o vôo pairado, partindo sem vibrar o corpo sobre as flores.

Euglossina foram observadas coletando resina em flores femininas e pólen em flores masculinas. Visitas com diferentes propósitos duraram aproximadamente o mesmo tempo (aproximadamente 30 segundos; Tabela 2.1). Estas abelhas visitaram apenas uma planta durante todo o período de estudo. Durante as coletas de resina estas abelhas tocaram a superfície estigmática com o terceiro par de pernas, enquanto coletavam resina com as mandíbulas. Apesar dessas abelhas não terem sido coletadas para a identificação o grupo foi reconhecido com base na coloração verde-azulada iridescente, o tamanho corporal e o formato do terceiro par de pernas, que apresenta uma estrutura em forma de uma corbicula.

Efeito da floração de plantas masculinas sobre o sucesso feminino

A taxa de produção de frutos foi significativamente maior em plantas próximas a indivíduos machos floridos (a) ($t = -2,09$; $df = 3 - 49$ $p < 0,05$). O número de flores no indivíduo masculino mais próximo (b) não esteve relacionado com a taxa de produção de frutos, enquanto a razão entre o número de flores masculinas e femininas (c) teve um tímido efeito negativo ($Y = 16,9 - 0,31 X_a + 0,02 X_b - 1,92 X_c$) (Figura 2.4). A regressão múltipla também foi significativa, no entanto apenas 14 % da produção de frutos foi explicada pelos fatores correlacionados ($F_{3,49} = 2,85$; $P < 0,05$; $r^2 = 0,14$).

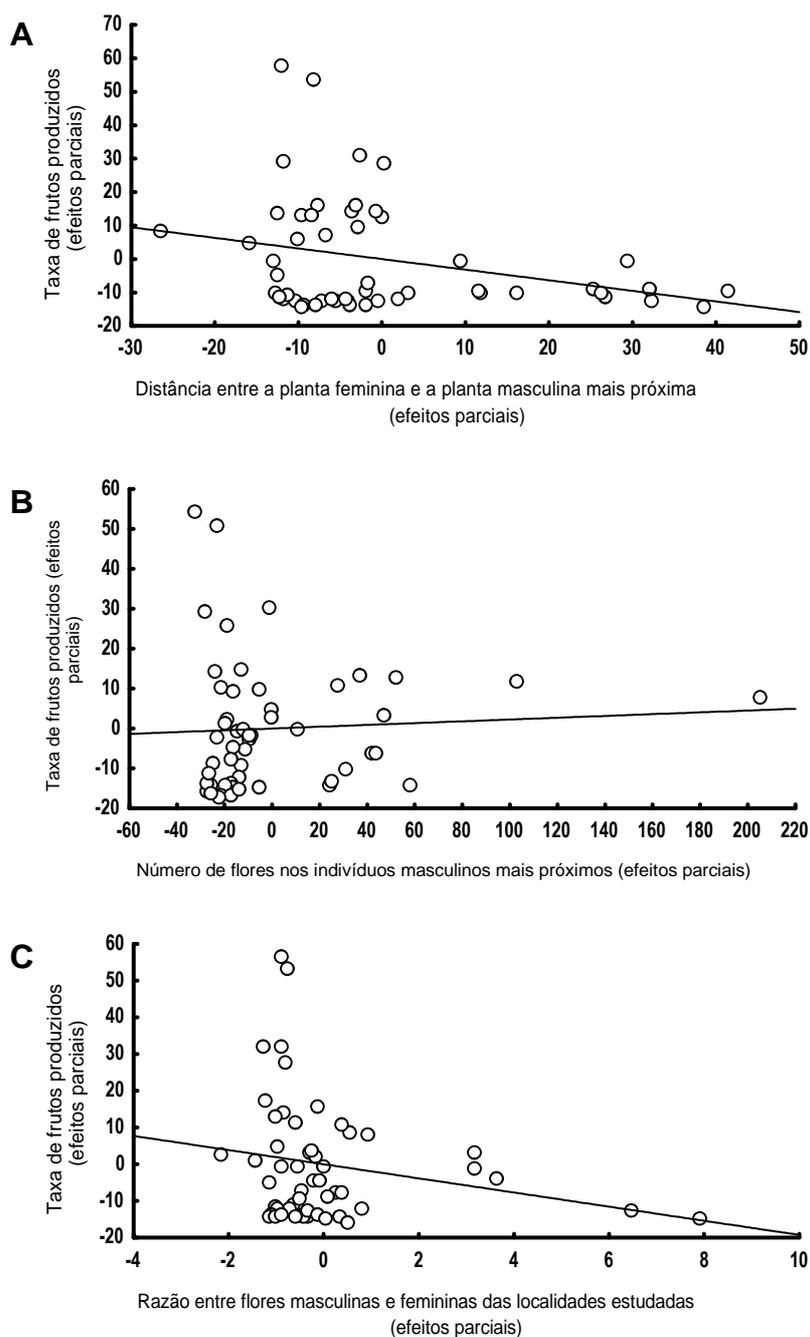


Figura 2.4. Correlações dos efeitos parciais de cada uma das variáveis consideradas na regressão múltipla usada para explicar a taxa de produção de frutos ($Y = 16,9 - 0,31 Xa + 0,02 Xb - 1,92 Xc$) ($F_{3,49} = 2,85$; $P < 0,05$; $r^2 = 0,14$). (a) Correlação dos efeitos parciais da taxa de produção de frutos e da distância entre a mesma e o indivíduo masculino florido mais próximo. (b) Correlação dos efeitos parciais da porcentagem de frutos produzidos por planta e o número de flores do indivíduo masculino mais próximo. (c) Correlação dos efeitos parciais entre a taxa de produção de frutos de cada indivíduo e a razão entre o número de flores femininas e o número de flores masculinas, em uma área de 35 metros de raio.

Razão sexual de flores nas áreas

A floração de *C. hilariana* é assincrônica entre as árvores, de forma que plantas masculinas e femininas iniciam a floração em diferentes datas durante a estação reprodutiva. Flores de uma mesma planta iniciaram a antese em diferentes horários do dia e estão completamente abertas 16 h após o começo da antese.

A média de flores masculinas por área por dia foi 18,6 (dp = \pm 16,3), enquanto a média de flores femininas por área por dia foi 7,0 (dp = \pm 5,6). O número de flores femininas por área foi significativamente menor do que o número de flores masculinas por área ($F_{1,16} = 10,76$; $p < 0,01$). Plantas masculinas têm inflorescência de duas (30 % das flores) ou três flores (12 % das flores), enquanto as flores femininas são solitárias.

A razão sexual (plantas femininas: plantas masculinas) foi de 1,4: 1, quando consideradas somente as plantas floridas maiores que 3 m, e com diâmetro basal de 0,2 m ($n = 42$). No entanto, quando consideradas todas as plantas dos sítios amostrais a razão foi de 1: 1,5 ($n = 50$). O valor obtido nas duas amostragens foi significativamente diferente ($t = -3,94$; $df = 1 - 17$; $p < 0,02$). Este resultado sugere que o maior número de flores masculinas por sítio amostral está relacionado com o fato das plantas masculinas pequenas já estarem fisiologicamente aptas à produção de flores ou que as plantas femininas tem maior longevidade.

O número de plantas masculinas por sítio amostral foi 50 % maior do que o número de plantas femininas, enquanto o número de flores masculinas por localidade foi 160 % maior do que o número de flores nas plantas femininas. A expressão sexual das plantas da área sexadas em 1999, não se alterou nos anos 2001, 2003, 2004 e 2006.

2.4. Discussão

Clusia hilariana apresentou características bem relacionadas com o automimetismo floral descrito por LITTLE (1983), como: (1) flores femininas morfologicamente similares às flores masculinas, (2) número de flores miméticas inferior ao número de flores modelo, por área, e (3) tempo das visitas em flores femininas inferior ao tempo das visitas em flores masculinas. As semelhanças entre flores masculinas e femininas foram observadas na coloração, no formato e no tamanho das partes florais. Esse padrão nem sempre é observado em outras espécies do gênero, que eventualmente têm os estudos de taxonomia prejudicados pela alta variação entre flores masculinas e femininas (BITTRICH e AMARAL, 1996a). Outras espécies miméticas de restinga (e.g., *C. criuva* estudada por CORREIA *et al.*, 1999), também apresentaram o sinândrio formado pela fusão de partes basais dos estames, à semelhança das flores masculinas de *C. hilariana*. Automimetismo em *C. hilariana* também é favorecido pelo (a) longo tempo de duração das flores femininas, (b) pelo longo período de receptividade estigmática e (c) pelo maior tempo de manutenção das características florais das flores femininas em comparação com as flores masculinas.

Não há inconsistência no tamanho das estruturas florais e suas relações com os polinizadores, pois apesar da grande área de exposição de resina sugerir que *C. hilariana* seja polinizada por abelhas grandes e médias, a ampla superfície estigmática é relacionada à polinização por abelhas pequenas (conforme ARMBRUSTER, 1984; ARMBRUSTER e WEBSTER, 1981; LOPES e MACHADO, 1998) e, principalmente, ao aumento da chance de ocorrência de polinização em visitas por engano (BAKER, 1976). O papel das características florais nas visitas por engano pode ser inferido com base na semelhança dos comportamentos dos visitantes florais em flores masculinas e femininas, como atividade de vibração. Apesar da presença de resina como recurso

floral ser inesperada (BAWA, 1980; BULLOCK e BAWA, 1981), a resina não pode ser considerada desperdício de recurso, pois sinais visuais e olfativos são fundamentais na discriminação dos recursos por abelhas (RENNER, 2005). Além disso, os dados sugerem que *C. hilariana* pode apresentar um sistema de polinização misto, onde o automimetismo favorece a efetivação de visitas por engano, enquanto a resina, como recurso de flores femininas, favorece a atração de abelhas especializadas. Apesar do número de visitas orientadas para a coleta de resina ter sido baixo, uma avaliação definitiva a respeito da importância dos visitantes florais deve considerar a eficiência dos mesmos na promoção de polinizações.

Os primeiros registros de mimetismo floral em *Clusia* foram feitos em *C. criuva* (CORREIA *et al.*, 1993). No entanto, devido à polinização por besouros, esta espécie apresenta algumas características discrepantes ao modelo de automimetismo de LITTLE (1983). A visitação por engano de abelhas pequenas e inespecíficas foi relacionada para *C. pusilla* em função da menor quantidade de flores femininas nas áreas e, principalmente, da baixa importância da resina para a ocorrência de visitas destas abelhas em flores femininas (BITTRICH e AMARAL, 1996a). De acordo com BAWA e OPLER (1975), o fluxo de pólen promovido por pequenas abelhas que voam pequenas distâncias é afetado pela distância entre indivíduos masculinos e femininos. Conseqüentemente, o automimetismo em plantas dióicas, polinizadas por pequenas abelhas que voam pequenas distâncias, só pode ter efeito quando as distâncias entre plantas masculinas e femininas forem reduzidas. O quadro descrito corresponde ao observado para *C. hilariana*, cujas plantas femininas próximas a plantas masculinas floridas produziram mais frutos do que as demais. Similarmente à *C. hilariana*, *C. nemorosa*, que forma grandes populações em áreas abertas, também apresenta automimetismo e polinização por engano por *Trigona spinipes* (LOPES e MACHADO, 1998).

A ocorrência de visitas por engano está relacionada à capacidade das abelhas aprenderem e evitarem as áreas com muitas flores mímicas. Conforme este pressuposto, as taxas de produção de frutos estariam correlacionadas com as taxas de flores femininas e masculinas dentro da escala de percepção do polinizador. A presença de polinizadores em uma determinada área estaria na dependência da frequência de visitas em flores com recursos em relação à frequência de visitas desperdiçadas em flores sem recursos (ROY e WIDMER, 1999). Esse pressuposto de dependência da densidade está em conformidade com o conceito de automimetismo, como um modelo de Mimetismo Batesiano intraespecífico (DAFNI, 1984). No entanto, no presente trabalho, a razão de flores femininas por flores masculinas teve pouco efeito na produção de frutos. Esse resultado pode ter sido em função da escala espacial adotada (raio de 35 metros ao redor da planta fêmea), que pode ter sido superior à escala de percepção dos polinizadores de *Clusia*. Apesar deste resultado, a maior polinização de flores femininas próximas aos indivíduos masculinos está em conformidade com os pressupostos do mimetismo Batesiano, conforme ROY e WIDMER (1999).

O mimetismo Batesiano sugere a existência de um tipo de seleção dependente de frequência contra o número de flores mímicas (ROY e WIDMER, 1999). Diferenças na taxa de apresentação de flores masculinas e femininas nas áreas pode ser uma evidência desse processo de seleção (ver MARTINS *et al.*, 2007). No entanto, essa hipótese é difícil de ser testada devido a diferenças no custo de produção de flores masculinas e femininas (FREEMAN *et al.*, 1976), como discutido abaixo.

As visitas por engano em *C. hilariana* não podem ser relacionadas à semelhança com outras espécies da restinga, que seria mais aplicável a dois outros tipos de modelos: (1) mimetismo Batesiano interespecífico (quando uma ou mais espécies sem recurso mimetiza outra espécie modelo) ou (2) mimetismo Mülleriano (quando diferentes espécies com recursos de diferentes qualidades convergem para a

mesma forma e todas as espécies envolvidas têm vantagem dentro do sistema mimético) (DAFNI, 1984; ROY e WIDMER, 1999). Isso porque, caso *Clusia hilariana* estivesse mimetizando outra espécie, estaria relacionada a um grupo de espécies pouco abundantes como *Kielmeyera membranacea* Casar., *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., *I. littoralis* Boiss (ORMOND *et al.*, 1993) e espécies de orquídeas (observação pessoal). Dessa forma, caso estivesse ocorrendo mimetismo Batesiano interespecífico as plantas masculinas de *C. hilariana* deveriam ser definidas obrigatoriamente como modelos, uma vez que é a espécie mais abundante da formação vegetal considerada (ARAUJO *et al.*, 2004). O caso de *C. hilariana* também não se aplica a (2), pois, segundo este modelo, as flores de *C. hilariana* deveriam ser polinizadas por conta de uma eventual semelhança com flores de plantas simpátricas resiníferas, que utilizem a mesma guilda de polinizadores. Isto não se dá, pois *C. hilariana* é a única espécie conhecida com flores resiníferas do PNRJ.

A distância do macho florido mais próximo, o número de flores do macho florido mais próximo e a razão do número de flores femininas pelo número de flores masculinas, em conjunto, explicaram 14 % da variação na produção de frutos. Isto pode ser devido à influência de outros fatores que também interferem nas inúmeras etapas entre a visitação e a produção de frutos, conforme discutido no *Capítulo 3 - Segunda Parte*.

O maior número de plantas masculinas maduras por sítio amostral, considerando plantas grandes e pequenas, evoca três hipóteses: (1) que plantas femininas alcançam a maturidade tardiamente em relação às plantas masculinas, (2) que plantas femininas vivem mais e crescem mais do que plantas masculinas e/ou (3) que plantas pequenas são ramos clonais dos indivíduos masculinos (OPLER e BAWA, 1978). A terceira hipótese, porém, pode ser descartada, pois as plantas pequenas incluídas foram indivíduos distintos, sem clonalidade, conforme verificado com base nos mesmos critérios de amostragem definidos no *Capítulo 1 - Segunda Parte*.

OPLER e BAWA (1978) discutem a diferença no amadurecimento da planta como uma evidência de diferenças relativas ao custo na produção de flores e para o sucesso reprodutivo feminino, que envolve gasto na produção de sementes. Este resultado está em consonância com o fato das flores masculinas de *C. hilariana* serem produzidas em maiores quantidades (LLOYD e WEBB, 1977). Tal fato também foi observado em *C. fluminensis* (CORREIA, 1983).

Em adição à economia de recursos devido à divisão das funções masculina e feminina, em plantas dióicas (BAWA e OPLER, 1975; FREEMAN *et al.*, 1976; THOMPSON e EDWARDS, 2001) o automimetismo floral está relacionada a um número reduzido de flores femininas e quantidade de recursos das mesmas (LLOYD e WEBB, 1977). Segundo LOKVAN e BRADOCK (1999), diferentes regimes seletivos afetam diferentemente plantas femininas e masculinas de espécies dióicas, particularmente do gênero *Clusia*, que possui espécies cujos diferentes sexos apresentam características florais muito discrepantes (VAASEN *et al.*, 2002). A polinização por engano em um sistema automimético pode ser vantajosa em ambientes oligotróficos, como áreas de restingas (LIEBIG *et al.*, 2001; MATAALLANA *et al.*, 2005; SCARANO *et al.*, 2005). No entanto, para ser eficiente em um modelo de polinização por pequenas abelhas que voam pequenas distâncias, a espécie deve ser abundante localmente.

Apesar de todas as inferências da ocorrência de automimetismo em flores de *C. hilariana*, a relação entre o número de visitas por engano e a produção de frutos será apresentada no *Capítulo 3 - Segunda Parte*, que evidência que o sucesso reprodutivo foi alcançado dentro do sistema de mimetismo floral, uma vez que a planta não apresenta agamospermia (conforme FARIA *et al.*, 2006).

Capítulo 3

Produção de flores e polinização por engano em *Clusia hilariana* Schldl. (Clusiaceae)

3.1. Introdução

A dioecia tem sido relacionada a ambientes oligotróficos devido à economia de recursos causada pela divisão de funções sexuais em plantas diferentes, o que afeta diretamente o sucesso reprodutivo individual (THOMPSON e EDWARDS, 2001). No entanto, áreas recentemente colonizadas como as restingas, tendem a apresentar uma menor diversidade, que é desfavorável à ocorrência de polinizadores e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de populações de espécies dióicas. Segundo FARIA *et al.* (2006), a baixa produção de frutos de plantas de *C. hilariana*, da área do PNRJ, nas florações de 1999 e 2001, estaria de acordo com a hipótese da ausência de polinizadores tipicamente florestais, ambiente do qual o gênero teria, supostamente, imigrado. Ao contrário desta interpretação, que sugere um importante papel da reprodução vegetativa para a expansão populacional da espécie, o *Capítulo 1 - Segunda Parte*, demonstra com base em dados moleculares um papel fundamental da reprodução sexuada, e simultaneamente propõe que a importância da reprodução assexuada esteja relacionada principalmente à manutenção de genótipos bem sucedidos, mas não à sua expansão territorial.

Os dados de FARIA *et al.* (2006) e de estrutura genética (*Capítulo 1 - Segunda Parte*), sugerem que a alta abundância local de *C. hilariana* foi alcançada em função da manutenção dos genótipos através de reprodução vegetativa e ocorrência de “bons anos” para a produção de frutos e recrutamento de plântulas (*Capítulo 1 - Segunda Parte*; MARTINS *et al.*, 2007). A evidência de que polinização pode estar sendo

alcançada dentro de um sistema de polinização por engano, que é favorecida em localidades onde existam altas densidades de plantas floridas, sugere que a polinização está na dependência da fenologia de floração das plantas de uma determinada localidade (DEGEN e ROUBIK, 2004), o que pode causar grandes variações na taxa de produção de frutos entre microhabitats. Dessa forma, a alta produção de flores pode ser efetivamente importante e, até mesmo, adaptativa, conforme a “hipótese da disponibilidade de flores” de GUITIAN (1993) (formulada com base no estudo de ÁGREN 1988).

CAMPBELL (1989) menciona que as condições para que haja uma alta produção de frutos pode ser rara, ocorrendo irregularmente em longos intervalos de tempo. Com base nesse pressuposto, o presente capítulo avaliou a reprodução de *C. hilariana* considerando as taxas de: (1) visitação de flores masculinas e femininas, (2) polinização, (3) fecundação, (4) frutificação e (5) produção de sementes, em mais duas estações reprodutivas, além das estudadas por FARIA *et al.* (2006), e em uma escala espacial de 5,06 ha distribuídos em uma área de 12 Km².

Objetivamente, o capítulo pretende responder à seguinte questão: a baixa produção de frutos é resultante de fracasso na polinização (como sugerido por FARIA *et al.*, 2006) ou é resultante de produção luxuriosa de flores? Nesse ponto é importante estabelecer a diferença entre os dois padrões. Baixa produção de frutos pode ser relacionada ao fracasso na reprodução sexual quando há ineficácia da síndrome de polinização diante do rol de polinizadores de determinado ambiente (BIERZYCHUDEK, 1981; NEILAND e WILCOCK, 1998). Por outro lado, a baixa produção de frutos pode ser um artefato da produção luxuriosa de flores femininas, cujo termo será empregado para indicar que a produção de flores é superior à produção média de frutos, sendo mantida por ser vantajosa em sítios e/ou em anos específicos, de acordo com a “hipótese da disponibilidade de flores” (GUITIAN, 1993; STEPHENSON, 1981). O esperado para *C. hilariana* é que ela se comporte conforme

o segundo cenário, de forma que seja possível identificar a ocorrência de polinizadores efetivos e uma ampla variação estocástica entre sítios amostrais e indivíduos na taxa de produção de frutos.

3.2. Material e Métodos

Taxa de visitas e visitantes florais

O estudo foi realizado em plantas de *C. hilariana* dos nove sítios amostrais no PNRJ, descritos no item 0.4., “Área de Estudo” (*Primeira parte*). As taxas de visitação foram obtidas para cada sítio amostral considerando o número de flores observadas e a percentagem de flores visitadas pelo menos uma vez durante o tempo de observação. Foram observadas 143 flores masculinas em 2003 e 294 flores masculinas em 2004, enquanto o número de flores femininas observadas foi de 130 e 285, respectivamente nos anos de 2003 e 2004.

As taxas foram obtidas em duas plantas de cada sexo e de cada sítio amostral no ano de 2003 (36 plantas, 18 de cada sexo) e quatro plantas de cada sexo de cada sítio amostral em 2004 (72 plantas, 36 de cada sexo). As amostragens em cada sítio estavam ditribuídas em intervalos de quatro semanas no primeiro ano (2003) e de três semanas no segundo ano (2004), sendo amostrados os 5 meses de floração que têm início em setembro e término em janeiro do ano subsequente. Em 2003, as observações foram feitas apenas no período da manhã (6:00 às 9:15 h), enquanto em 2004 duas árvores de cada sexo de cada área foram observadas pela manhã, uma árvore de cada sexo e de cada sítio amostral no período do meio dia (10:00 às 13:15) e uma árvore de cada sexo de cada sítio amostral no período da tarde (14:00 às 17:15).

Plantas masculinas e femininas foram monitoradas concomitantemente nos períodos observados. Cada planta de cada sexo foi observada em cinco sessões de 15 min com um intervalo de 5 min entre a observação de cada sexo. Para cada sexo foi observado um total de 67 h e 30 min. As observações foram feitas em dias sem chuva com média térmica de 26°C ($\pm 2,4$; n = 57 dias). As plantas que foram avaliadas com relação à taxa de visitação e produção de frutos foram escolhidas com base no estágio fenológico de floração, incluindo somente plantas que apresentavam mais de 51 % de botões abertos. Este critério foi utilizado para evitar a escolha de plantas no início da floração, o que poderia incluir árvores que ainda não tinham sido localizadas pelos polinizadores. Em cada planta foram observadas todas as flores de uma área da copa, contendo, no mínimo, 6 flores abertas. As flores observadas estavam expostas à visitação por diferentes períodos, evitando incluir somente flores de um mesmo período o que poderia limitar o registro a um grupo de visitantes que abordam as flores novas, em detrimento de outros visitantes tardios. Os visitantes florais que não foram identificados pelo observador foram coletados ao final da observação para posterior identificação, conforme o *Capítulo 2 - Segunda Parte*.

No final do período de observação foram contados (1) o número de flores da planta feminina e (2) o número total de flores femininas do sítio amostral. (1) e (2) foram correlacionados com a taxa percentual de visitação no dia da observação.

As flores também foram observadas no período noturno, para a verificação de eventuais visitantes. As observações noturnas foram feitas em 18 incursões, entre as 18 e 23 horas, totalizando 18 h de observação por sexo. Visitantes noturnos foram procurados ativamente em 300 flores de cada sexo. A ocorrência de polinizações no período da noite foi avaliada por meio da exposição controlada de flores aos visitantes noturnos. Para essa avaliação, 30 botões foram ensacados durante o dia e expostos, após a abertura, aos possíveis visitantes do período entre 19:00 e 5:00 horas. As

flores ficaram expostas durante duas noites e a partir de então foram ensacadas até a abscisão ou a deiscência do fruto.

Polinização e fecundação

Os tubos polínicos foram observados por meio da coloração dos tecidos florais por anilina azul e microscopia de fluorescência, conforme técnica de fluorescência de MARTIN (1959). O tempo de crescimento do tubo-polínico foi avaliado em flores polinizadas e, posteriormente, coletadas após um intervalo de 24 e 48 h. Duas flores de cada tratamento foram estudadas em duas plantas femininas diferentes.

A taxa de polinização e fecundação foi estimada em 4 flores de cada sítio amostral, no primeiro ano (totalizando 36 flores femininas), e 15 flores por sítio amostral, no segundo ano (totalizando 135 flores femininas). Desta forma, com base na ocorrência de tubos polínicos, foram estimadas: (1) a percentagem de flores polinizadas e de óvulos fecundados para os dois anos avaliados e (2) a percentagem de flores fecundadas e óvulos fecundados, por sítio amostral, no segundo ano. Foram amostradas flores expostas aos visitantes por um período aproximado de 24 h. No total foram avaliadas 171 flores.

A taxa de polinização foi mensurada pela percentagem de flores com tubos polínicos nos tecidos condutores, considerando 4 estigmas da flor avaliada. Os tubos polínicos foram procurados em uma seção longitudinal do estigma, de aproximadamente 0.5 mm², que incluía parte da superfície estigmática e o ponto de convergência dos tecidos de condução, na base do estigma.

A taxa de fecundação considerou a percentagem de flores com tubos polínicos penetrando na micrópila dos óvulos de dois ovários da flor avaliada. Os quatro estigmas de cada gineceu avaliado estavam simetricamente orientados, assim como

os dois carpelos onde foram avaliadas a presença de tubo polínico na micrópila e tecidos placentários.

Produção de frutos e sementes

Ao final da observação, as flores femininas do respectivo sítio amostral foram etiquetadas e acompanhadas até a abscisão ou deiscência do fruto. A taxa de produção de frutos por sítio amostral foi estimada percentualmente dentro do total de flores marcadas. Ao final do período de floração os frutos etiquetados foram ensacados em saco de organza e mantidos em isolamento até a abertura da cápsula. O número de sementes dos frutos ensacados foi contado e a taxa de produção de sementes por sítio amostral foi calculada em valores percentuais, considerando o valor máximo de sementes possíveis como o valor médio de óvulos por flor e o número de frutos avaliados. O valor médio de óvulos por flor foi obtido por meio da contagem de óvulos na estimativa da percentagem de óvulos fecundados.

A percentagem de frutos produzidos por sítio amostral foi correlacionada com o número de flores visitadas e com a taxa de flores polinizadas. A percentagem de frutos foi correlacionada com a percentagem de sementes produzidas para verificar se a redução no número de frutos é seguida da diminuição na produção de sementes.

Análise da variação temporal

A avaliação da variação temporal considerou os nove sítios amostrais como repetições. Foi utilizado ANCOVA para: (1) comparar a percentagem de flores femininas visitadas nos diferentes anos, em correlação com a variação na percentagem de flores masculinas visitadas; e (2) comparar a percentagem de frutos produzidos nos diferentes anos, em correlação com a taxa de visitação de flores femininas. Também foi correlacionada a variação anual na percentagem de visitas de

flores femininas com a percentagem de frutos produzidos por área e com a percentagem de sementes produzidas por área.

Também foi utilizada ANCOVA para comparar a percentagem de óvulos fecundados por ano, considerando a correlação com a percentagem de flores femininas visitadas e de frutos produzidos por sítio amostral.

Para o ano de 2004, a percentagem de flores visitadas em cada período do dia (manhã, meio do dia e tarde) foi comparada para cada sexo, por ANOVA. Para tanto, uma planta de cada um dos sítios amostrais foi considerada como repetição, totalizando nove réplicas de cada período do dia.

Analise da variação espacial

A variação na taxa de visitação dos diferentes sítios amostrais foi comparada para os diferentes sexos por meio de ANOVA. Para a avaliação da variação espacial foi considerado somente o segundo ano de estudo (2004), contabilizando 63 plantas, 4 em cada sítio amostral.

1.3. Resultados

Taxa de visitas e visitantes florais

Em 2003, 21,4 % das flores femininas observadas foram visitadas (28 flores de 130), enquanto que em 2004 houve uma redução para 6,2 % (18 flores de 285). Das flores masculinas observadas em 2003, 66,7 % (95 flores de 143) foram visitadas, enquanto em 2004 a taxa caiu para 41,9 % (123 de 294) (Figura 3.1, ver também tabela 3.2.).

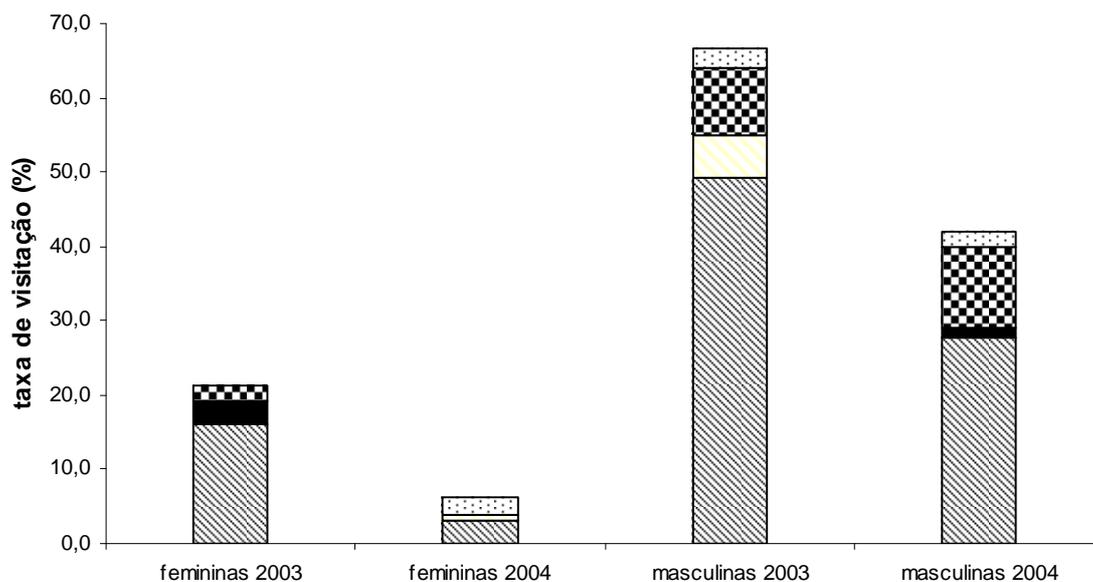


Figura 3.1. Percentual de visitas dos diferentes grupos de abelhas em flores masculinas e femininas de *Clusia hilariana* Schltdl. (Clusiaceae) nas florações de 2003 e 2004, Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. O padrão de coloração das barras corresponde aos valores relativos de visitação de: Augochlorini (listras diagonais); *Apis mellifera* L. (área quadriculada); *Trigona spinipes* Fabr. (área pontilhada); *Xilocopa brasiliatorum* L. (área branca), e Euglossina (área preta).

Clusia hilariana foi visitada por diferentes espécies de abelhas que apresentaram comportamentos distintos. O comportamento das espécies de abelhas também variou em relação às flores masculinas e femininas. Foram observados cinco táxons como visitantes de flores masculinas e femininas e Euglossina como visitante exclusivo de flores femininas. O grupo de visitantes mais comum foi o de abelhas Augochlorini, que incluiu abelhas *Augochloropsis roatalis* Vachal e *Augochlorella* sp.. Augochlorini visitaram flores masculinas para a coleta de pólen, no entanto foram os visitantes mais comuns em flores femininas onde não coletavam recursos. Em 2003, Augochlorini visitou 49,3 % das flores masculinas observadas (143), e 16 % das flores

femininas (130), enquanto em 2004 Augochlorini visitou 27,9 % das flores masculinas observadas (294) e 3,2 % das flores femininas (285).

Apis mellifera L. coletou, principalmente, pólen como recurso floral, e os eventos de coleta de resina foram observados em plantas fora dos sítios amostrados. Nas visitas de *A. mellifera* em flores femininas não houve coleta de recursos, havendo apenas um pouso rápido sobre a flor. Em 2003, *A. mellifera* visitou 9,1 % das flores masculinas observadas (143) e 2,3 % das flores femininas (130). Em 2004, *A. mellifera* visitou 10,9 % das flores masculinas observadas (284).

Trigona spinipes Fabr. foi registrada coletando pólen e resina em flores masculinas e resina em flores femininas. Parte das visitas em flores femininas não envolvia coleta de recurso. *Trigona spinipes* visitou apenas 2,8 % das flores masculinas observadas em 2003 (143), mas no ano de 2004, visitou 2,3 % das flores femininas observadas (285) e 2,1 % das flores masculinas (284).

Xylocopa brasilianorum L. foi observada em flores masculinas e realizando atividade de vibração em flores femininas. Essas abelhas visitaram 5,6 % das flores masculinas observadas em 2003 (143) e 0,7 % das flores femininas observadas em 2004 (285).

Abelhas Euglossina visitaram 3,1 % das flores femininas visitadas em 2003 (130) e 1,1 % das flores masculinas visitadas em 2004 (284). Apesar de Euglossina ter sido identificada com base na cor, tamanho e formato do terceiro par de pernas, não foi possível coletar o(s) exemplar(es), o que permitiria uma identificação até níveis taxonômicos mais precisos. As visitas de Euglossina ocorreram em apenas uma planta feminina (dentre as 18 avaliadas no primeiro ano) localizada no cordão arenoso mais continental a aproximadamente 1,2 km da costa. As visitas foram regulares na planta, ocorrendo no período entre 7:00 e 8:00 horas da manhã, em cinco dias consecutivos,

em dezembro de 2003. Essa frequência regular pode ter superestimado a importância desse grupo, que teve uma atuação pontual, justamente no intervalo de tempo em que foram feitas as duas amostragens na localidade.

A taxa de visitação nas flores femininas não foi relacionada aos fatores relativos à floração da planta feminina avaliados: (a) número de flores da mesma planta ($t = 0,09$; $df = 2 - 33$; $p < 0,92$) e (b) número de flores femininas do sítio amostrado ($t = -1,11$; $df = 2 - 33$; $p < 0,27$) (taxa de visitação = $13,9 + 0,01 \cdot \text{número de flores da planta feminina} - 0,08 \cdot \text{número de flores do sítio amostrado}$). Não foram observados visitantes florais noturnos, e as flores expostas durante a noite não deram origem a frutos.

Polinização e fecundação

Grãos de pólen depositados na superfície estigmática gastaram menos de um dia para atingir a micrópila, de forma que não houve diferença significativa entre o número de óvulos fecundados 24 e 48 h antes da coleta e fixação da flor. Aproximadamente 50 % das flores coletadas após um dia de exposição (171 flores) tiveram tubos polínicos convergindo para o interior dos ovários. A fecundação foi observada em 28 % das flores coletadas e aproximadamente 3 % dos óvulos das flores (considerando 4017 óvulos analisados) estavam fecundados nas flores de um dia. Cada flor feminina possui em média (dp) 104 (± 25) óvulos (171 flores). A tabela 3.1 mostra os resultados de (1) taxa de flores polinizadas, (2) taxa de flores com óvulos fecundados e (3) o número de óvulos fecundados, por localidade e por ano.

Tabela 3.1. Valores percentuais de: (1) flores polinizadas, (2) flores com óvulos fecundados e (3) óvulos fecundados em cada uma das localidades amostradas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil, floração de 2003 e 2004. Valores entre parênteses representam o número de flores analisadas ou o número de óvulos contabilizados por área. Médias totais foram seguidas dos desvios padrões.

Localidade	Flores com óvulos					
	Flores polinizadas		fecundados		Óvulos fecundados	
	2003	2004	2003	2004	2003	2004
(n)	% (n)	(n)	% (n)	% (n)	% (n)	
1	(4)	66,6 (15)	(4)	40,0 (15)	6,32 (95)	5,49 (328)
2	(4)	40,0 (15)	(4)	13,3 (15)	2,38 (84)	0,57 (348)
3	(4)	26,6 (15)	(4)	20,0 (15)	7,37 (95)	2,39 (335)
4	(4)	13,3 (15)	(4)	6,6 (15)	0,00 (98)	1,06 (378)
5	(4)	20,0 (15)	(4)	6,6 (15)	7,69 (91)	0,26 (392)
6	(4)	33,3 (15)	(4)	20,0 (15)	1,12 (89)	0,84 (359)
7	(4)	33,3 (15)	(4)	0,0 (15)	1,75 (114)	0,00 (371)
8	(4)	40,0 (15)	(4)	33,3 (15)	1,22 (82)	4,94 (324)
9	(4)	46,6 (15)	(4)	26,6 (15)	3,70 (81)	7,08 (353)
Total	63,8	35,5 ± 15,6	36,1	18,5 ± 13,2	3,5 ± 2,9	2,4 ± 2,6
(n)	(36)	(135)	(36)	(135)	(829)	(3188)

Produção de frutos e sementes

Em média 27 % das flores marcadas (n=1040) formaram frutos, apresentando valores máximos de 46 % e mínimos de 10 % para um mesmo sítio amostral nos respectivos anos de 2003 e 2004 (Tabela 3.2). Considerando os 212 frutos e o número médio de óvulos por fruto (104), aproximadamente 30 % dos óvulos de cada fruto se tornaram sementes (Tabela 3.2). Não existe correlação entre o número de frutos e o número de flores polinizadas por sítio amostral no ano de 2004 ($t = 1,25$; $df = 2 - 7$; $p =$

0,24). Os dados do número de sementes também não estão relacionados com o número de frutos por sítio amostral ($F_{2,16} = 2,84$; $p = 0,11$; produção de sementes = $22,65 + 0,32 \cdot \text{produção de frutos}$).

Tabela 3.2. Percentagem de visitas em flores masculinas e femininas de *Clusia hilariana* Schlttdl. (Clusiaceae) e taxa de produção de frutos e sementes nas estações reprodutivas de 2003 e 2004, Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. Valores entre parênteses representam o número de flores avaliadas para se calcular a taxa de visitação e a taxa de produção de frutos e, no cálculo da percentagem de sementes, o número de frutos que tiveram as sementes contadas. Os valores percentuais de produção de sementes são relativos aos valores médios de óvulos por flor (104 óvulos), multiplicado pelo número de frutos contados (valores entre parênteses).

Sítio amostral	Taxa de visitação				Produção de frutos		Produção de sementes	
	Masculinas		Femininas		2003	2004	2003	2004
	2003	2004	2003	2004				
1	52,6 (19)	28,6 (35)	20,0 (15)	9,1 (33)	27,4 (58)	16,2 (69)	43,9 (18)	34,4 (11)
2	66,7 (15)	51,4 (37)	36,4 (11)	18,2 (35)	30,4 (49)	17,8 (73)	34,5 (12)	26,4 (11)
3	100,0 (16)	18,2 (33)	41,2 (17)	15,2 (32)	45,7 (49)	19,4 (62)	46,6 (12)	26,8 (12)
4	76,9 (13)	13,8 (29)	21,4 (14)	6,1 (31)	46,0 (58)	10,0 (60)	22,0 (25)	23,2 (10)
5	30,4 (23)	47,2 (36)	16,7 (12)	6,1 (31)	13,3 (48)	11,6 (69)	21,2 (08)	21,2 (07)
6	52,9 (17)	50,0 (30)	23,1 (13)	0 (34)	24,4 (56)	17,7 (62)	35,5 (11)	32,1 (11)
7	78,6 (14)	35,3 (34)	27,3 (11)	6,1 (32)	28,7 (50)	15,9 (63)	44,6 (14)	34,2 (07)
8	61,5 (13)	62,1 (29)	7,7 (13)	6,1 (28)	27,0 (50)	33,3 (55)	33,3 (09)	26,0 (16)
9	76,9 (13)	41,9 (31)	8,3 (24)	18,2 (29)	15,2 (49)	32,2 (60)	16,5 (07)	23,3 (11)
Total	66,7	41,9	21,4	6,1	32,4	21,9	33,7	27,4
	(143)	(294)	(130)	(285)	(467)	(573)	(116)	(96)

Variação temporal

A taxa de visitas em flores femininas variou significativamente entre os anos avaliados ($F_{2,16} = 10,38$; $p < 0,005$). Essa variação esteve correlacionada com a taxa de visitas em flores masculinas ($t = 2,6$; $df = 1 - 16$; $p = 0,01$), que também variou significativamente nos anos considerados ($F_{2,16} = 9,02$; $p = 0,008$) (Figura 3.2).

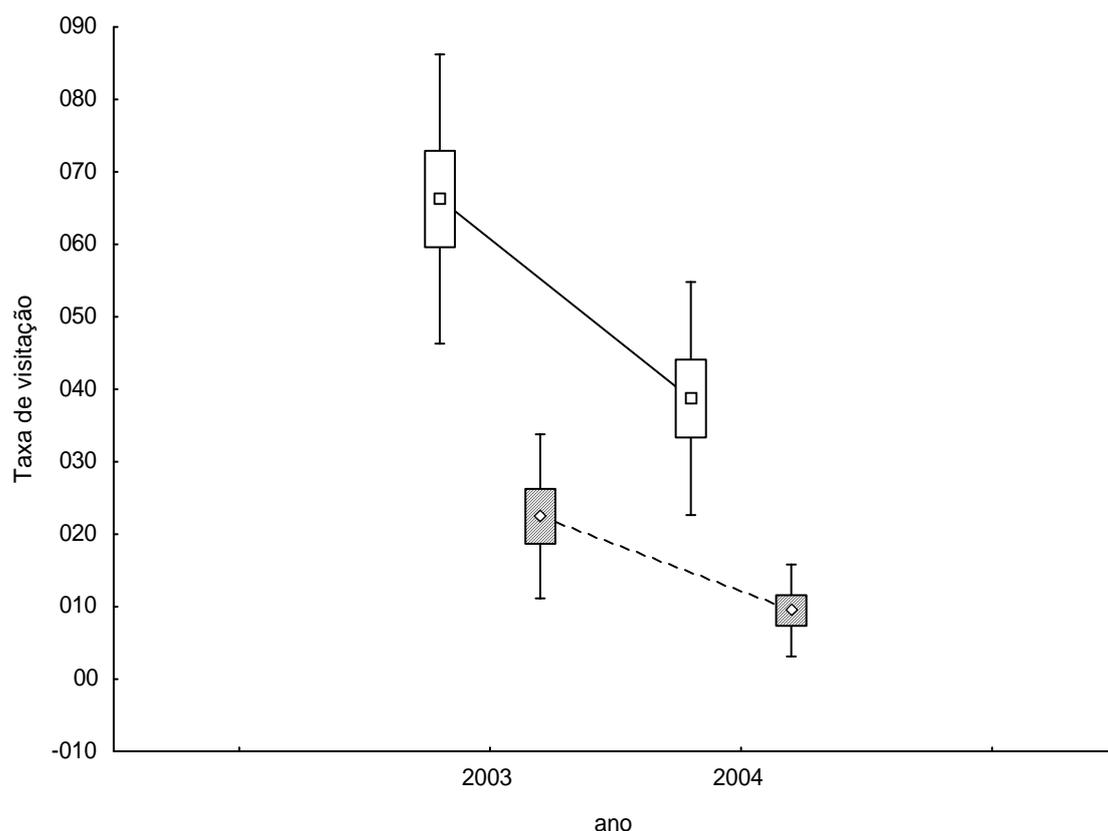


Figura 3.2. Média e erro padrão (caixas) e desvio padrão (barras verticais) da taxa percentual de visitas em flores masculinas (caixa branca) e femininas (caixa hachurada) de *Clusia hilariana* Schltdl. (Clusiaceae), nas estações reprodutivas de 2003 e 2004, Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil.

O número de visitas em flores femininas esteve correlacionado com a taxa de produção de frutos e sementes ($t = 3,38$; $df = 1 - 16$; $p < 0,003$ e $t = 2,43$; $df = 1 - 16$; p

< 0,02, respectivamente). Não existiu diferença significativa entre o número de frutos e sementes produzidos nos diferentes anos (Figura 3.3.).

A taxa de óvulos fecundados também não variou significativamente nos anos estudados. A percentagem de óvulos fecundados não foi correlacionada com a variação na taxa de visitação e produção de frutos (Figura 3.3.).

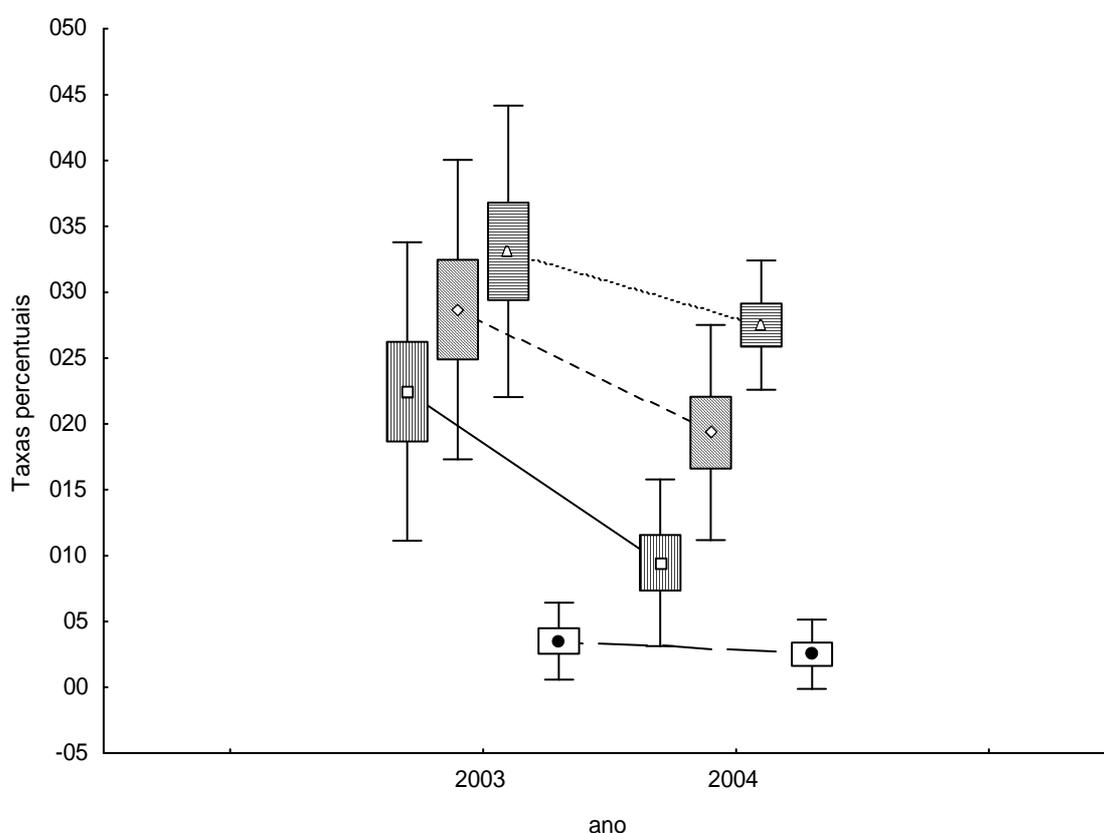


Figura 3.3. Média, erro padrão (caixas) e desvio padrão (barras verticais) da percentagem de: flores visitadas (caixas com listras verticais), produção de frutos (caixas com listras diagonais), taxa de produção de sementes (caixas com listras horizontais) e flores fecundadas (caixas brancas). Valores estimados para *Clusia hilariana* Schltdl. (Clusiaceae), nas estações reprodutivas de 2003 e 2004, Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil.

Não houve diferença significativa entre o número de flores visitadas nos diferentes períodos do dia, considerando flores masculinas ($F_{2,24} = 0,07$; $p = 0,93$) e flores femininas ($F_{2,24} = 0,14$; $p = 0,87$).

Variação espacial

Não houve diferença na percentagem de flores femininas visitadas nos diferentes sítios amostrais, considerando-se o ano de 2004 ($F_{9,26} = 1,04$; $p = 0,43$) (Figura 3.4). A taxa de visitação de flores masculinas também não variou significativamente entre os anos ($F_{8,27} = 1,59$; $p = 0,17$) e o padrão encontrado não estava correlacionado com a taxa de visitação em flores femininas ($t = 1,21$; $df = 9 - 26$; $p = 0,43$). A taxa de produção de frutos e sementes não variou significativamente entre os sítios amostrais ($F_{8,27} = 0,69$; $p = 0,69$ e $F_{8,27} = 0,22$; $p = 0,98$, respectivamente), como esperado devido à correlação entre a produção de frutos/sementes e a taxa de visitação.

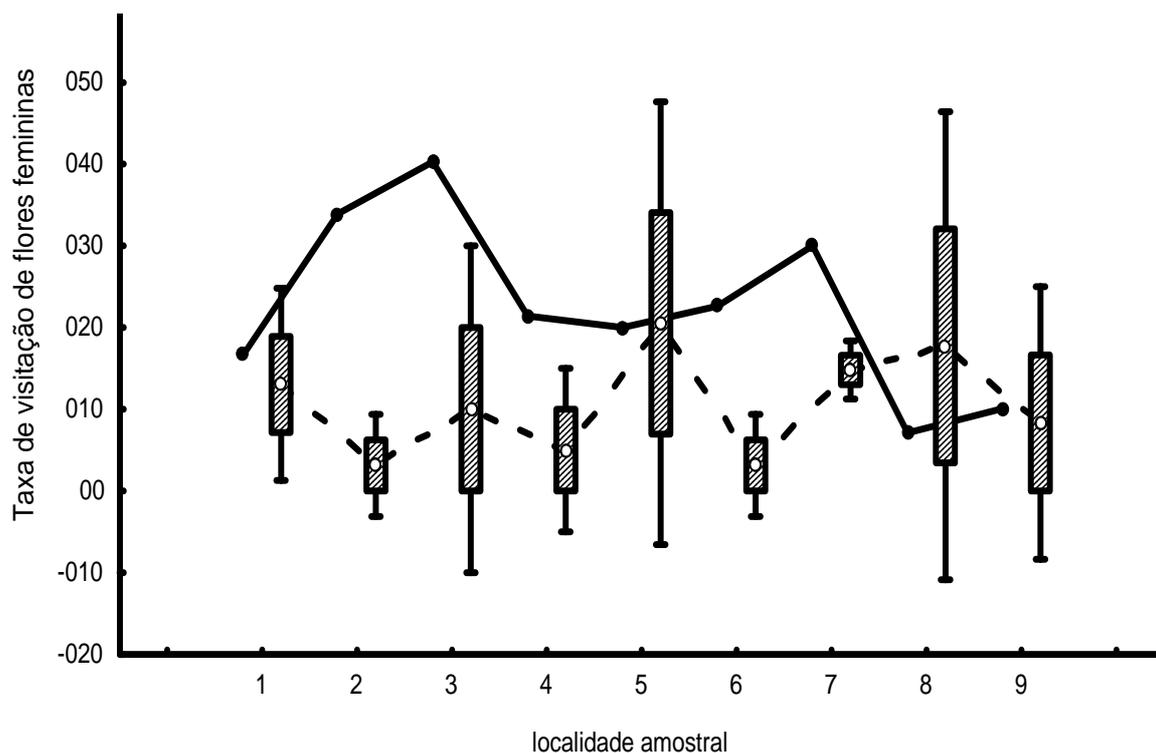


Figura 3.4. Média, erro padrão (caixas) e desvio padrão (barras verticais) da porcentagem de flores femininas de *Clusia hilariana* Schltld. (Clusiaceae) visitadas por sítio amostral, na floração de 2004 do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. Linha contínua representa a média de flores femininas visitadas por área na floração de 2003.

2.4. Discussão

Os resultados não confirmaram a ocorrência de baixa produção de frutos em *C. hilariana*, pois a produção de frutos de *C. hilariana* alcançou valores próximos a 50 % que é a média de produção de frutos de plantas dióicas, obtida por SUTHERLAND e DELPH (1984) para 31 espécies de plantas dióicas pesquisadas (com valores mínimos de 13 % e máximos de 100 %). As localidades com maiores valores de produção de frutos não diferiram estatisticamente das áreas com baixos valores, em função da alta variação entre plantas de uma mesma localidade. A alta variação na produção de frutos resultou na inexistência de diferença entre vários parâmetros analisados, e a produção de frutos está sujeita a fatores estocásticos que afetam uma pequena escala

espacial, conforme sugerido pelo *Capítulo 2 - Segunda Parte*, em consonância com a hipótese de luxúria na produção de flores femininas.

O fracasso na polinização tem sido associado com a baixa freqüência de polinizadores em sistemas de polinização por engano de espécies de orquídeas sem recursos. No entanto, esse modelo de fracasso de polinização de orquídeas está, geralmente, associado a espécies raras (NEILAND e WILCOCK, 1998), diferentemente de *C. hilariana* que é a planta mais abundante do ambiente de restinga (ARAUJO *et al.*, 2004), e cuja abundância foi alcançada via reprodução sexual (*Capítulo 1 - Segunda Parte*). Em orquídeas com polinização por engano, a manutenção das populações locais é explicada pelo longo período de vida da planta que aumenta as chances de reprodução e supera a baixa produção de frutos por estação reprodutiva (CALVO e HORVITZ, 1990). Se esse modelo for aplicado à *C. hilariana*, o sucesso reprodutivo dos indivíduos e, conseqüentemente, alta dominância desta espécie na restinga estudada pode ter sido alcançada em função do sucesso variável ao longo de diferentes estações reprodutivas.

A variação temporal e espacial na produção de frutos corrobora a “hipótese da disponibilidade de recursos”, uma vez que a alta disponibilidade de flores pode favorecer a ocorrência de visitas por engano e, conseqüentemente, produção de frutos em eventos de alta disponibilidade de polinizadores (ÁGREN, 1988; GUITIAN, 1993). A variação na produção pode ser relacionada à polinização por abelhas com diferentes comportamentos que, em sua maioria, apresenta pouca especificidade na coleta de resina e que, geralmente, visitam as flores por engano em função da densidade de plantas floridas por área e a intensidade de floração (*Capítulo 2 - Segunda Parte*). A variação na produção de frutos das localidades não está correlacionada com o número de flores produzidas por plantas femininas descartando a hipótese de que a alta produção de flores é importante na atração de polinizadores (GUITIAN, 1993; STEPHENSON, 1979).

Outros fatores podem estar provocando a diferença entre o sucesso na produção de frutos e a produção de flores femininas que podem ser identificados caso as plantas respondam aos diferentes pressupostos das diferentes hipóteses relacionadas à produção luxuriosa (GUITIAN, 1993; STEPHENSON e WINDSOR, 1986; SUTHERLAND, 1987). Como exemplo, uma taxa variável de produção de frutos pode estar relacionada com a taxa de aborto. Em *C. hilariana* o aumento no número de visitas foi bem relacionado com a produção de frutos e sementes sugerindo que, sob baixas taxas de visitação, as plantas investem em frutos com baixa quantidade de sementes (CAMPBELL, 1989; STEPHENSON, 1981). Dessa forma, parte da produção luxuriosa pode estar favorecendo a otimização da produção de frutos (conforme a “hipótese de abortos seletivos” de GUITIAN, 1993).

A ausência de estruturação genética obtida no *Capítulo 1 - Segunda Parte* e a dominância de *C. hilariana* reforçam os dados de eficiência do sistema de polinização, considerando os polinizadores registrados. Porém, os dados genéticos não permitem avaliar a distribuição da biodiversidade em uma escala espacial maior, o que irá garantir uma visão da eficiência da dispersão, considerando que a polinização ocorra em uma escala espacial limitada. Os dados de diversidade genética das subpopulações dos diferentes sítios amostrais são apresentados no próximo capítulo (*Capítulo 4 - Segunda Parte*).

Capítulo 4

A variabilidade genética de *Clusia hilariana* Schltdl. (Clusiaceae)

4.1. Introdução

Áreas geologicamente recentes e recém colonizadas, como as restingas, tendem a apresentar uma menor diversidade genética quando comparadas a populações de áreas mais antigas (MORAES *et al.*, 2005; NEI *et al.*, 1975; NEI, 2005). Essa diminuição da diversidade se deve à colonização, com base em poucos indivíduos selecionados pelas condições do novo ambiente. A diversidade genética das áreas recém colonizadas tende a aumentar gradualmente em função de eventos de mutação, migração e fluxo de pólen. Dessa forma, a dioecia pode acelerar a distribuição da variabilidade gerada por mutação e introduzida por eventos de dispersão, aumentando a diversidade genética das populações (CHUNG *et al.*, 1999; CHUNG e EPPERSON, 2000; SEBBENN *et al.*, 1998). Contraditoriamente, a polinização por abelhas generalistas que voam pequenas distâncias, conforme observado em *C. hilariana*, tende a promover a fixação de alelos e diminuir a heterozigosidade, caso a dispersão não seja eficiente e também promova a estruturação genética das populações.

Apesar do limitado fluxo gênico esperado dentro do sistema de polinização por engano, as populações de *C. hilariana* não apresentam estruturação genética em pequenas escalas espaciais ($\geq 5m$), o que sugere que a planta pode apresentar um eficiente sistema de dispersão (*Capítulo 1 - Segunda Parte*). Dados da dispersão da simpátrica *C. criuva*, cujas sementes e frutos apresentam as mesmas estruturas atrativas das sementes e frutos de *C. hilariana*, sugerem que os propágulos de *C. hilariana* são dispersos nas fezes de aves e, eventualmente, transportados por

formigas, anfíbios e lagartos (PASSOS e OLIVEIRA, 2002; F.R. SCARANO, comunicação pessoal). A eficiência da dispersão na diminuição da heterozigosidade das populações depende do comportamento dos dispersores, porém, a tendência é de que a diversidade obtida em populações de plantas dispersas por animais seja superior à diversidade obtida por plantas dispersas por outros agentes (HAMRICK *et al.*, 1993; TAKEUCHI *et al.*, 2004).

Conforme apresentado no *Capítulo 1 - Segunda Parte*, a alta diversidade genotípica em uma pequena área pode ser favorecida pelo rigor na germinação de sementes e a persistência temporal de genótipos. No entanto, apesar do conhecimento da restrita importância da propagação vegetativa na colonização dos ambientes e dos dados da ecologia da polinização, os resultados apresentados na tese até o presente momento, não permitem uma visão da estruturação genética da população estudada. Neste contexto o presente capítulo avalia a diversidade genética de *C. hilariana* em nove subpopulações, dos respectivos sítios amostrais, avaliando as semelhanças entre as mesmas. Também foi verificado se a diversidade genética de *C. hilariana* é comparável a outras plantas dióicas tropicais.

4.2. Material e métodos

Amostragem

O estudo considerou 90 plantas de *C. hilariana*, distribuídas em nove transectos de 10 plantas. As 10 plantas de cada transecto estavam distribuídas em intervalos de 50 metros de forma que cada transecto era de, aproximadamente, 450 metros de extensão. Os transectos incluíam plantas maiores que 3 metros de altura e 0,20 m de diâmetro ao nível da base. Os transectos foram dispostos paralelos à costa, no topo dos cordões arenosos, atravessando os respectivos sítios amostrais (Figura

4.1.). Invariavelmente, os transectos amostravam duas plantas de cada um dos sítios amostrais de 50x50 m. As plantas de cada transecto foram consideradas como subpopulações do PNRJ.

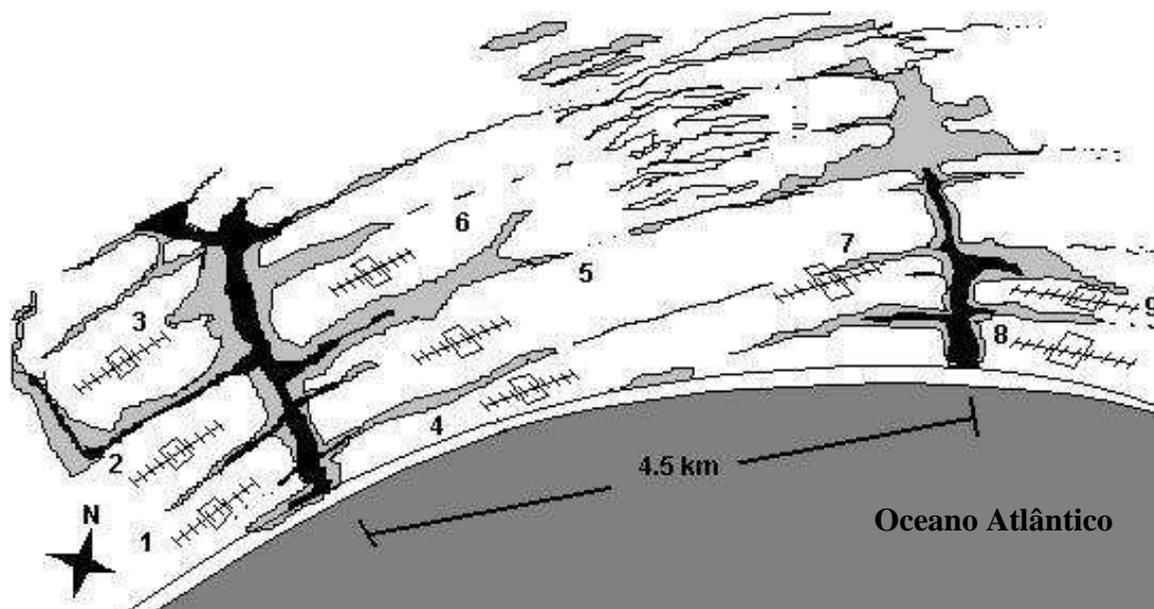


Figura 4.1. Esquema da área de estudo no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. Os números representam os cordões arenosos onde foram definidos os sítios amostrais e os respectivos transectos. Em negro as lagoas Cabiúnas (entre os sítios amostrais 1 – 6) e Comprida (entre os sítios amostrais 7 – 9) e em cinza as formações de mata ao redor dos braços das lagoas.

As coletas foram feitas antes do período reprodutivo, amostrando aleatoriamente indivíduos masculinos e femininos. Foram coletadas aproximadamente cinco folhas novas de um único ramo da planta. As folhas foram coletadas e armazenadas em frascos de 50 ml de sílica gel, por um período inferior a cinco dias. No laboratório as folhas foram transferidas para um freezer -80°C , onde ficaram estocadas por um período inferior a 12 meses, até a extração do DNA.

Procedimentos laboratoriais

A extração e quantificação do DNA genômico das amostras de *C. hilariana*, foi feita conforme apresentado na *Capítulo 1 - Segunda Parte*. As reações de AFLP consideraram as mesmas combinações de iniciadores e os mesmo procedimentos apresentados no *Capítulo 1 - Segunda Parte*. O tamanho dos fragmentos amplificados foi analisado por meio de eletroforese em capilares em um seqüenciador automático, ABI Prism Gene Mapper[®] (Applied Biosystem). Os fragmentos fluorescentes foram lidos como picos em um eletroferograma e convertidos em algoritmos pelo programa ABI Prism Gene Mapper Software Version 3.0 (Applied Biosystems). Cada pico gerado por um fragmento (banda) foi considerado um *loco*. As matrizes binárias de presença e ausência foram transferidas para uma planilha comum a outros programas de análises genéticas. Os dados genéticos utilizados para elaboração deste capítulo foram obtidos em um outro *set* de análises revelando *loci* diferentes dos amostrados no *Capítulo 1 - Segunda Parte*. A diferença na intensidade da leitura das bandas (picos) e a freqüência de ocorrência dos mesmos também afetaram o padrão de *loci* considerados.

Análise dos dados

As análises consideraram 87 plantas, pois uma planta da subpopulação 1 e duas plantas da subpopulação 4 não apresentaram reação positiva para as combinações de iniciadores. Para as análises foram considerados os *loci* com freqüência superior a 10 % e inferior a 95 %, para evitar desvios nas estimativas causados por polimorfismos produzidos de maneira artificial (LYNCH e MILLIGAN, 1994).

A diversidade genética, avaliada por meio do cálculo da percentagem de *loci* polimórficos e da heterozigidade esperada (NEI, 1978 *apud* MILLER, 1997), foram estimadas utilizando-se o programa TFPGA (Tools for Population and Genetics Analysis - MILLER, 1997). Para os cálculos foi assumido que os *loci* estavam em

equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido à característica dominante do marcador do tipo AFLP. O programa TFPGA também foi utilizado para o cálculo das diferenças genéticas F_{st} e distâncias genéticas Nei (D) (NEI, 1978 *apud* MILLER, 1997) entre subpopulações. As distâncias genéticas D foram utilizadas para organizar as subpopulações em um dendrograma cujas distâncias entre nós foram calculadas com base na média das distâncias genéticas dos pares (UPGMA). Também foi realizada uma Análise de Variância Molecular, no programa Arlequim (Versão 2000, SCHNEIDER *et al.*, 2000), para verificar se as diferenças entre pares de subpopulações são significativas. Este software utiliza a matriz de distância euclidiana entre pares de indivíduos para a produção de um valor de diferenciação genética Φ_{st} , análogo ao F_{st} de WRIGHT (1965). Um procedimento não paramétrico da AMOVA testa a hipótese da ausência de estruturação genética entre as populações considerando o valor Φ_{st} obtido dentro de uma distribuição nula de valores de Φ_{st} , produzidos por permutações de padrões de bandas de indivíduos diferentes entre as populações analisadas (EXCOFFIER *et al.*, 1992). A distribuição aleatória foi obtida para os pares de subpopulações por meio de 1000 permutações.

As análises da distribuição da variabilidade genética dentro e entre subpopulações também foram realizadas por meio de uma Análise de Variância Molecular, no programa Arlequim (Versão 2000, SCHNEIDER *et al.*, 2000). A distribuição aleatória foi obtida para os dois níveis hierárquicos analisados, diferença entre subpopulações e diferença dentro das subpopulações, em 1000 permutações.

4.3. Resultados

Diversidade genética

A avaliação da diversidade genética por meio de marcadores do tipo AFLP, utilizando-se quatro combinações de iniciadores (EcoRI + 2 / MseI + 4), revelaram 710 *loci* nas amostras das nove subpopulações de *C. hilariana*. Desconsiderando *loci* freqüentes e raros as análises utilizaram, aproximadamente, 55 % de todos os *loci* produzidos pelas combinações de iniciadores. A média de *loci* polimórfico para as subpopulações variou de 57,6 a 77,3 % (Tabela 4.1), enquanto a heterozigidade esperada (*He*) variou de 0,153 a 0,206 considerando todos os *loci* amplificados pelas quatro combinações de marcadores. A heterozigidade média esperada para todas as subpopulações foi (*Ht*) de 0,261.

Tabela 4.1. Estimativa de diversidade genética em subpopulações de *C. hilariana*, número total de *loci* AFLP, porcentagem de *loci* polimórficos, *He* (heterozigidade média esperada por subpopulação) e *Ht* (heterozigidade média esperada total).

Iniciadores		% de <i>loci</i> polimórficos das subpopulações									<i>He</i> das subpopulações									
Eco+2/ Mse+4	Nº de <i>loci</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<i>Ht</i>
		(N=9)	(N=10)	(N=10)	(N=8)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)										
CA/GACC	33	84,8	90,0	90,9	60,6	78,8	39,4	87,9	78,8	75,8	0,239	0,247	0,308	0,135	0,214	0,143	0,264	0,235	0,238	0,271
CA/GCAC	19	73,7	78,9	63,1	68,4	68,4	52,6	52,6	68,4	63,1	0,220	0,261	0,203	0,216	0,218	0,176	0,166	0,195	0,224	0,267
CC/GACC	56	85,7	80,3	80,3	58,9	67,8	55,3	71,4	73,2	71,4	0,271	0,197	0,224	0,153	0,169	0,157	0,198	0,213	0,184	0,220
CC/GCAC	39	79,5	76,9	76,9	76,9	71,8	76,9	69,2	66,7	82,0	0,250	0,172	0,189	0,186	0,186	0,223	0,191	0,206	0,206	0,245
CG/GACC	21	71,4	71,4	52,4	57,1	61,9	47,6	76,2	61,9	85,7	0,223	0,163	0,118	0,140	0,158	0,138	0,166	0,162	0,256	0,199
CG/GCAC	55	80,0	90,9	76,4	83,6	78,2	81,8	81,8	70,9	72,7	0,168	0,162	0,126	0,223	0,210	0,204	0,215	0,207	0,192	0,200
CT/GACC	56	83,9	64,3	48,2	60,7	57,1	50,0	64,3	57,1	78,6	0,229	0,137	0,093	0,136	0,127	0,086	0,127	0,109	0,208	0,156
CT/GCAC	111	84,7	91,9	79,3	63,9	71,2	81,1	59,5	63,9	70,3	0,234	0,241	0,245	0,179	0,179	0,235	0,155	0,178	0,220	0,239
Total	390	76,7	77,3	67,7	57,6	63,1	57,6	63,6	59,6	73,5	0,206	0,182	0,177	0,153	0,158	0,165	0,163	0,173	0,201	0,261

Números de 1 a 9 correspondem as diferentes subpopulações amostradas; N = número de indivíduos avaliados.

Diferença genética entre subpopulações

O nível de diferenciação genética entre as subpopulações analisadas foi alto, conforme o índice *Fst*, que foi de 0,099 (dp = \pm 0,009). Analisando o *Fst* par a par (Tabela 4.2), observa-se que os valores não divergem muito entre subpopulações. Houve diferença significativa entre todos os pares de subpopulações analisados por AMOVA (com valores de $P < 0,01$).

Tabela 4.2. Estimativa de *Fst* para as nove subpopulações de *C. hilariana* utilizando 390 *loci* polimórficos de AFLP.

Subpopulações	1	2	3	4	5	6	7	8
1 (N=9)	-							
2 (N=10)	0,091 (\pm 0,017)	-						
3 (N=10)	0,109 (\pm 0,014)	0,006 (\pm 0,005)	-					
4 (N=8)	0,118 (\pm 0,019)	0,078 (\pm 0,015)	0,092 (\pm 0,016)	-				
5 (N=10)	0,148 (\pm 0,020)	0,069 (\pm 0,013)	0,088 (\pm 0,011)	0,029 (\pm 0,012)	-			
6 (N=10)	0,148 (\pm 0,020)	0,124 (\pm 0,005)	0,104 (\pm 0,016)	0,056 (\pm 0,014)	0,050 (\pm 0,012)	-		
7 (N=10)	0,155 (\pm 0,024)	0,093 (\pm 0,020)	0,112 (\pm 0,018)	0,080 (\pm 0,016)	0,037 (\pm 0,011)	0,071 (\pm 0,014)	-	
8 (N=10)	0,152 (\pm 0,021)	0,099 (\pm 0,018)	0,112 (\pm 0,015)	0,083 (\pm 0,018)	0,057 (\pm 0,015)	0,068 (\pm 0,017)	0,052 (\pm 0,017)	-
9 (N=10)	0,165 (\pm 0,024)	0,132 (\pm 0,023)	0,145 (\pm 0,022)	0,155 (\pm 0,022)	0,110 (\pm 0,017)	0,123 (\pm 0,021)	0,092 (\pm 0,019)	0,094 (\pm 0,063)

Subpopulações em cordões arenosos próximos apresentaram distâncias genéticas menores, conforme o dendrograma apresentado na Figura 4.1. As subpopulações 4-8 formaram um grupo bem definido cujas distâncias genéticas entre as mesmas são pequenas. Esse grupo corresponde ao conjunto de áreas compreendidas entre a lagoa Comprida, a nordeste, e a lagoa Cabiúnas, a sudoeste. As subpopulações 2 e 3, na parte externa da área circundada pelas lagoas formaram um outro grupamento. As subpopulações que se diferenciaram das demais foram a 1 e a 9, que representaram respectivamente os limites sudeste e nordeste da área estudada.

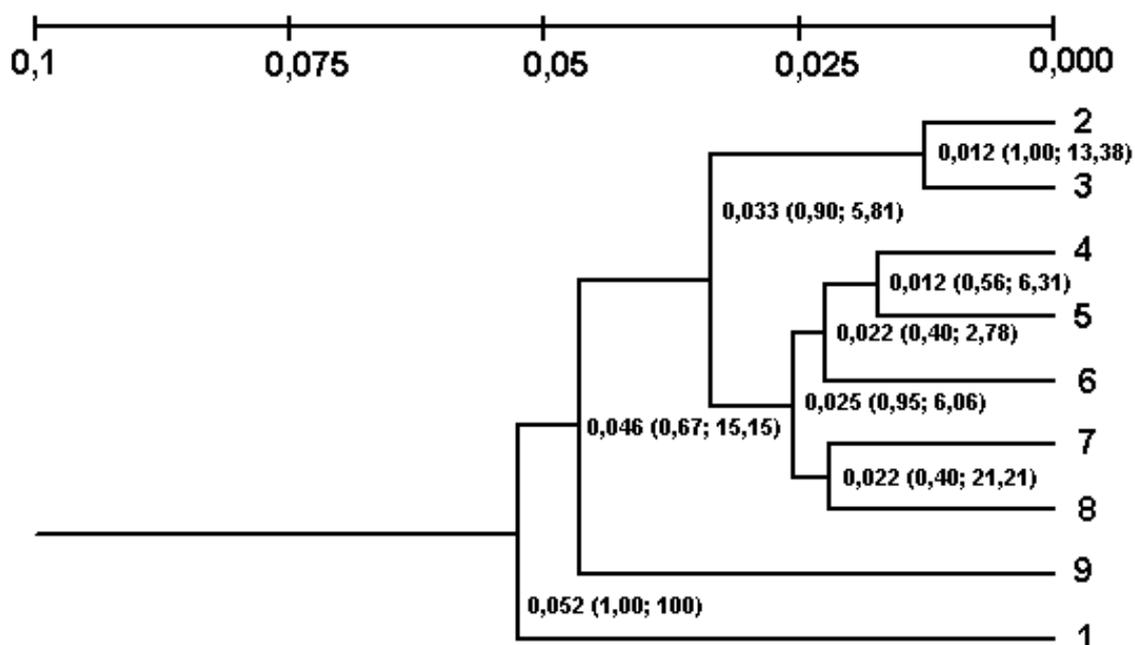


Figura 4.2. Dendrograma baseado na distância genética de Nei (D) para as nove subpopulações de *Clusia hilariana* Schtdl. utilizando 390 *loci* polimórficos de AFLP (ver Figura 4.1 para localização das subpopulações dos respectivos sítios amostrais). Valores entre parênteses representam a proporção de replicatas que apresentaram o respectivo nó em 1000 “bootstraps” e a percentagem de *loci* que suportam cada nó.

Distribuição da variabilidade genética

A Análise da Variância Molecular dos fenótipos de AFLP distribuídos entre as populações analisadas revelou diferenciação genética significativa entre as subpopulações ($\Phi_{st} = 0,08099$; $P < 0,0001$) em consonância com as análises de diferenciação entre os pares de subpopulações (Tabela 4.3). Porém, do total de variação genética encontrada, apenas 8,1 % está entre subpopulações, enquanto 91,9 % está dentro das subpopulações.

Tabela 4.3. Distribuição da variabilidade genética dentro e entre subpopulações de *C. hilariana* do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, conforme resultados da análise de variância molecular (AMOVA). O valor de P foi calculado considerando os valores de Φ_{st} e da variância obtidos em comparação com uma distribuição nula dos mesmos valores, computados 1000 vezes após a realocação de padrões de bandas obtidos entre os indivíduos analisados. Valores de $P < 0,05$ rejeitam a hipótese nula de ausência de diferenciação genética.

Fonte de variação	G.L.*	Soma dos quadrados	Estatística Φ_{st}	Porcentagem da variação	P
Entre subpopulações	8	718,423	0,08099	8,1	< 0,0001
Dentro das subpopulações	78	3783,439	0,91901	91,9	< 0,0001
Total	86	4501,861			

* Graus de liberdade.

4.4. Discussão

A significativa diferenciação genética e o fato das populações se relacionarem em conformidade com a distribuição espacial dos sítios amostrais indicam que as populações de *C. hilariana* estão geneticamente estruturadas. Estes dados estão em conformidade com os dados de ecologia da polinização que sugerem um fluxo gênico restrito promovido, basicamente, por abelhas que voam pequenas distâncias em um sistema de polinização por decepção. Neste panorama a dispersão tem um papel crucial no aumento da diversidade genética das subpopulações o que, somado com o recrutamento dependente da germinação em bromélias-tanque, tende a diminuir a chance de plantas relacionadas ocorrerem próximas (conforme apresentado no *Capítulo 1 - Segunda Parte*).

A variação genética de *C. hilariana* é mais pronunciada quando considerada as diferenças dentro das populações (91,9%), o que sugere que o fluxo gênico entre populações é intenso (LOVELESS e HAMRICK, 1984). No entanto, diversos fatores podem influenciar os níveis de diversidade genética de plantas tropicais (HAMRICK *et al.*, 1992), devendo se considerar outros parâmetros relacionados ao fluxo de alelos entre populações. A maior taxa de variação genética dentro das populações do que entre populações, encontrada em *C. hilariana*, está de acordo com o obtido para espécies arbóreas tropicais em geral (SEBBENN *et al.*, 1998). Para estas, HAMRICK e GODT (1990 *apud* SEBBENN *et al.*, 1998) observaram que 82 % da variabilidade genética total se concentra dentro das populações. Valores similares também foram encontrados para *Eugenia uniflora* L., uma espécie que também ocorre na restinga e cuja variação genética dentro das populações foi de 88 % (MARGIS *et al.*, 2002). Ainda para *E. uniflora* os valores de diferenciação genética entre populações foram altos indicando um limitado fluxo gênico (MARGIS *et al.*, 2002).

O valor de diferenciação genética entre as subpopulações foi inferior a valores médios obtidos para plantas estudadas por meio de marcadores dominantes, conforme revisão de NYBOM (2004), que apresenta valores médios estatisticamente consistentes para grupos de espécies com diferentes estratégias de vida. A diferenciação genética calculada para *C. hilariana* foi menor do que a encontrada por NYBOM (2004) em plantas de estágio sucessional tardio ($\Phi_{st} = 0,23$; $n = 16$), perenes ($\Phi_{st} = 0,25$; $n = 37$), tipicamente de reprodução sexuada ($\Phi_{st} = 0,27$; $n = 38$) e cujas sementes são dispersas após a ingestão por animais ($\Phi_{st} = 0,27$; $n = 22$). No entanto, baixos valores de diferenciação genética, indicativos de alto fluxo gênico entre populações, podem ser encontrados em populações geneticamente estruturadas, uma vez que o padrão de colonização das áreas também tem influência sobre este parâmetro (SLATKIN 1977).

Ao contrário do valor de Φ_{st} , os valores de heterozigosidade das subpopulações de *C. hilariana* são baixos, em conformidade com os valores médios encontrados para os grupos de espécies perenes de vida curta ($H_{pop} = 0,20$; $n = 17$), com sistema de cruzamento misto ($H_{pop} = 0,18$; $n = 8$) e de estágio sucessional intermediário ($H_{pop} = 0,21$; $n = 28$) (NYBOM, 2004). Baixas taxas de heterozigosidade estão relacionadas a (1) altas taxas de endocruzamento (LOVELESS *et al.*, 1998), (2) espécies com populações de tamanhos reduzidos (NEI e GRAUR, 1984) e/ou (3) populações que tiveram tamanhos reduzidos em períodos ancestrais (NEI, 2005). Todos estes fatores podem estar atuando em conjunto na redução da heterozigosidade, no entanto, a dioecia de *C. hilariana* não corrobora a hipótese de endocruzamento e os baixos valores de diferenciação genética entre populações sugerem que *C. hilariana* poderia ter passado por um processo drástico de redução da população (NEI, 2005), o que pode estar relacionado ao processo de colonizador a partir de um pequeno número de indivíduos fundadores (SLATKIN, 1977). Em teoria, depois de um evento fundador a partir de pouco indivíduos, os valores de H

tendem a aumentar ao longo do tempo com o surgimento de mutações e o aumento da frequência das mesmas por deriva (NEI, 2005) e a ocorrência de eventos de dispersão de longa distância.

A provável ocorrência de um “efeito do fundador” corrobora uma hipótese de endemismo de *C. hilariana* para a restinga, uma vez que, para que esse efeito seja efetivo, a população colonizadora precisa ser pequena, se mantendo isolada das populações originais durante o processo de colonização, o que aumenta as chances de ocorrência de um processo de especiação (MAYR, 1963; NEI, 2005). Na atual fase de conhecimento de distribuição de espécies de restinga, problemas taxonômicos e de amostragem dificultam o entendimento do processo de formação dessa vegetação, principalmente se considerado o conhecimento atual sobre *Clusia* (ARAUJO e SCARANO, 2007). O conhecimento da área de ocorrência de populações de *C. hilariana* assim como estudos comparativos da diversidade e grau de isolamento entre populações em tipos vegetacionais distintos, considerando que *C. hilariana* também possa ocorrer em mata atlântica, irá permitir o entendimento do processo de colonização e origem dessa espécie, assim como da capacidade de dispersão e do fluxo gênico entre populações (conforme ARAUJO e SCARANO, 2007).

TERCEIRA PARTE:

Discussão geral

Conclusão

Discussão geral

Clusia hilariana espécie chave para o entendimento da restinga

Os capítulos apresentados ao longo da tese perpassam diferentes níveis biológicos para o entendimento da importância da reprodução sexuada na manutenção das populações de *C. hilariana*. Isso porque a resiliência da população de *C. hilariana* frente às mudanças naturais e antrópicas, em teoria, estaria diretamente relacionada à diversidade genética. O desaparecimento das populações de *C. hilariana* das áreas de restinga poderia afetar níveis mais gerais como a biodiversidade local, os processos de ciclagem de nutrientes e seqüestro de carbono (ver *Introdução geral - Primeira parte*; ARAUJO e SCARANO, 2007; DIAS *et al.*, 2006). No entanto, os dados obtidos sugerem que as populações se mantêm por reprodução sexuada e que os níveis de diversidade genética são comparáveis ao encontrado em outras plantas tropicais, tendendo a um aumento gradual da heterozigosidade, principalmente, em função da manutenção temporal dos genótipos. A importância da reprodução sexuada também coloca em evidência o papel de outras plantas facilitadoras da restinga como as bromélias-tanque, responsáveis por 70 % do recrutamento das sementes de *C. hilariana* (SAMPAIO *et al.*, 2005; SCARANO, 2002; SCARANO *et al.*, 2004). Estudos que considerem grandes escalas geográficas permitirão um melhor entendimento do fluxo genético entre populações e a evolução da espécie, assim como estudos que revejam a taxonomia e a distribuição da espécie, conforme apresentado no tópico abaixo.

A origem de C. hilariana

As áreas de restinga apresentam uma idade geológica condizente com a hipótese de que a população estudada tenha origem em uma época recente. A comprovação da

origem das populações de restinga a partir de populações da Mata Atlântica deve ser estudada considerando outras populações de restingas. Se os padrões de heterozigidade forem similares para todas as populações de *C. hilariana* isso será um bom indício da colonização a partir da Mata Atlântica. Porém, se a taxa de heterozigotos na população estudada for menor do que a taxa obtida em outras áreas de restinga isso será um indício de que a população teve origem a partir de populações de restinga adjacentes à área PNRJ.

Nestas duas hipóteses apresentadas, a manutenção da baixa heterozigidade na população estudada só pode ocorrer se a população tiver se mantido isolada da população original, mais antiga, na fase inicial da colonização. Porém, no primeiro caso, isso poderia indicar que *C. hilariana* passou por um recente processo de especiação, sendo uma espécie endêmica de restinga. A origem de *C. hilariana* a partir de um recente evento de especiação obteve respaldo a partir da descoberta de que indivíduos de *C. hilariana* registrados no interior da Mata Atlântica, no município de Santa Tereza, Espírito Santo, são, na verdade, indivíduos de *C. aemygdioi*. Conforme ARAUJO e SCARANO (2007) (com base em ARAUJO, 2000), o possível endemismo de *C. hilariana* a colocaria na pequena lista de espécies endêmicas das restingas. Neste contexto, *C. hilariana* teria sua origem provável a partir de um grupo de plantas que ocupavam habitats abertos no interior da Mata Atlântica, e que já poderiam se beneficiar de um sistema de polinização por engano, uma vez que esse sistema é comum em espécies congêneres que formam grandes populações em áreas abertas no entorno de matas (*C. pusilla*, BITTRICH e AMARAL, 1996a; *C. insignis*, BITTRICH e AMARAL, 1997; *C. nemorosa*, LOPES e MACHADO, 1998; MESQUITA e FRANCISCON, 1995) e em substratos rochosos no interior de florestas (como a própria *C. aemygdioi*, conforme G. MALLANA, comunicação pessoal). Pesquisas futuras sobre a origem de *C. hilariana* devem

considerar as relações filogenéticas entre a mesma e *C. aemygdioi*, que ocorre em áreas rochosas abertas do interior da Mata Atlântica, próxima às restingas, e apresentam diversas características morfofisiológicas similares à *C. hilariana*.

Automimetismo é adaptativo para C. hilariana?

Três requisitos são necessários para que um caráter seja considerado adaptativo: (1) deve conferir vantagem, (2) ser herdável e (3) ser resultante da evolução da espécie no ambiente em que confere vantagem, o que é geralmente observado pela redundância no aparecimento da característica no ambiente, por convergência ou paralelismo (WAKE, 1991). Os dados apresentados nos diferentes capítulos indicam que, além da taxa média de visitas por engano ser igual às taxas obtidas para outras plantas dióicas, as visitas por engano estiveram relacionadas à produção de frutos, de forma que o mimetismo floral, assim com a produção luxuriosa de flores, pode estar conferindo vantagem à espécie.

Segundo dados de filogenia de *Clusia*, por GUSTAFSSON *et al.* (2007), o mimetismo floral surgiu independentemente na evolução do grupo. Como exemplo, o automimetismo foi descrito em *C. criuva* (CORREIA *et al.*, 1993) e *C. pusilla* (BITTRICH e AMARAL, 1996), que são mais distantes filogeneticamente de *C. hilariana* que a simpátrica não automimética *C. lanceolata*. Outras congêneres filogeneticamente distantes de *C. hilariana* também apresentam sinais de automimetismo, como *C. gundlachii* (GUSTAFSSON, 2000), e registros de polinização por engano, como *C. insignis* (BITTRICH e AMARAL, 1997), *C. nemorosa* (LOPES e MACHADO, 1998), *Clusia marizii* Gomes da Silva, e *C. aemygdioi* Gomes da Silva e Weinberg (G. MATALLANA, comunicação pessoal). Esse paralelismo pode ser explicado pela intensa coleta de pólen por abelhas inespecíficas (conforme descrito por BITTRICH e AMARAL, 1996; CORREIA, 1983; CORREIA *et al.*, 1989 e 1999; LOPES e MACHADO, 1998; RAMÍREZ e GÓMEZ,

1978) e o importante serviço de polinização que essas abelhas podem oferecer em ambientes em que as plantas ocorram em alta densidade. A dioecia, que impõe regimes seletivos diferentes sobre plantas masculinas e femininas (MEAGHER e ANTONOVICS, 1982; NICOTRA, 1998; LOKVAN e BRADOCK, 1999), também pode ter favorecido a evolução do mimetismo floral em plantas femininas de populações com alta densidade de plantas masculinas, tornando o caráter redundante nesse grupo, que apresenta automimetismo ou polinização por engano em 7 das 28 espécies estudadas quanto à biologia floral (MARTINS *et al.*, 2007).

Diante do exposto, o automimetismo pode ser considerado adaptativo para *C. hilariana*, principalmente, considerando a baixa taxa de visitação de abelhas interessadas em resina nas flores de *C. hilariana* do PNRJ. Neste sentido, resina pode ter um papel mais importante em outras áreas de ocorrência de *C. hilariana*, como descrito por CEZÁRIO (2007) em um estudo com populações de *C. hilariana* do Sul do Espírito Santo e extremo norte do Rio de Janeiro, porém tem uma importância secundária na polinização das plantas do PNRJ.

Resina nas flores de C. hilariana

O papel da resina na polinização de *C. hilariana* do PNRJ sugere que esse caráter plesiomórfico da seção Phloianthera, que inclui a espécie (GUSTAFSSON *et al.*, 2007), possa ser um caráter não funcional. A resina pode ser um recurso importante na polinização de flores femininas de outras populações de *C. hilariana* (conforme CEZÁRIO, 2007), porém, caso esta não seja funcional para a espécie como um todo, o esperado é que o acúmulo de mutações degenerativas, seletivamente neutras, possa tornar a resina um caráter vestigial, caso ocorra fixação das mesmas por deriva genética (DORKEN *et al.*, 2004). A redução na produção de resina em flores femininas, assim como variações

nas propriedades físicas das resinas dos diferentes sexos, não são bons indicativos da vestigialização da resina, uma vez que as estruturas secretoras da resina de flores masculinas e de flores femininas são diferentes (BITTRICH e AMARAL, 1996a). Também com relação às propriedades antimicrobianas da resina, as pressões seletivas independentes em plantas masculinas e femininas dificultam a comparação da função entre os sexos, pois as resinas de flores masculinas e femininas podem ter evoluído independentemente, sendo mais eficientes quando utilizadas de maneira complementar (LOKVAN e BRADDOCK, 1999). Dessa forma, a única maneira de se constatar uma degeneração do caráter e das funções do caráter seria a comparação das flores de diferentes plantas e a verificação de uma grande variação nas propriedades da resina, em comparação com espécies visitadas em função da resina. A ampla variação encontrada nas diferentes flores seria um bom indicativo do acúmulo de variações, umas mais degenerativas que outras, no caráter.

Conclusão

- *Clusia hilariana* não apresenta estruturação genética em nenhuma das escalas analisadas, o que é um indicativo de que a reprodução clonal teve um papel limitado na colonização dos ambientes de restinga estudados.
- A reprodução clonal pode estar ocorrendo em uma escala espacial reduzida (< 5m) sendo importante, principalmente, para manutenção temporal dos genótipos.
- O padrão de visitas em *C. hilariana* sugere que a espécie pode apresentar um sistema de polinização misto, onde o automimetismo favoreceria visitação por engano e a resina, como recurso de flores femininas, atrairia abelhas especializadas.
- Todas as características florais, assim como o padrão de apresentação de flores em plantas masculinas e femininas de *C. hilariana*, sugere que a espécie apresenta mimetismo floral. Inclui-se como fator importante no mimetismo a presença de resina em flores femininas que pode atuar na manutenção de atributos visuais e olfativos fundamentais para a polinização por abelhas.
- A taxa de produção de frutos está de acordo com a taxa média de produção de frutos de espécies dióicas, contradizendo as hipóteses de fracasso na polinização.
- As taxas de produção de frutos foram bastante variáveis localmente e temporalmente, não havendo nenhum padrão que indique diferenças entre as áreas, com seus respectivos atributos.
- A taxa de produção de frutos está relacionada à variação na apresentação de flores masculinas nas localidades, de forma que a proximidade de plantas masculinas floridas promova o aumento na taxa de produção de frutos das plantas femininas.
- A taxa de apresentação de flores femininas pode favorecer uma interpretação que considere a ocorrência de fracasso na polinização, porém a produção luxuriosa de

flores pode aumentar a taxa de visitas por engano, conforme o padrão estocástico de produção de frutos.

- A alta divergência genética entre subpopulações sugere que a polinização ocorra entre plantas próximas devido à expressiva visitação de abelhas que voam pequenas distâncias.
- As baixas taxas de heterozigosidade em contraste com a alta diferenciação genética entre populações indicam que a população pode ter passado por um “efeito do fundador”, conforme a hipótese de que as áreas de restinga tenham sido colonizadas a partir de poucos indivíduos da Mata Atlântica. No entanto, novos estudos que considerem outras populações podem ser importantes para um veredicto final a respeito da colonização dos ambientes de restinga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÅGREN, J., 1988, "Between-year variation in flowering and fruit set in frost-prone and frost-sheltered populations of dioecious *Rubus chamaemorus*", *Oecologia*, v. 76, pp. 175–183.
- ANTONOVICS, J., LEVIN, D. A., 1980, "The ecological and genetic consequences of density-dependence regulation in plants", *Ecology*, v. 77, pp. 1779-1790.
- ARAUJO, D. S. D., 1992, "Vegetation types of sandy coastal plains of tropical Brazil: a first approximation". In: Seeliger, U. (ed), *Coastal plant communities of Latin America*, pp. 337-347, New York, Academic Press.
- ARAUJO, D. S. D., 2000, *Análise florística e fitogeográfica das restingas do Estado do Rio de Janeiro*. Tese de D. Sc., UFRJ, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.
- ARAUJO, D. S. D., PEREIRA, M. C. A., PIMENTEL, M. C. P., 2004, "Flora e estrutura de comunidades na Restinga de Jurubatiba – síntese dos conhecimentos com enfoque especial para a Formação aberta de *Clusia*". In: Rocha, C. F. D., Esteves, F. A., Scarano, F. R. (eds), *Pesquisas de longa duração na Restinga de Jurubatiba: ecologia, história natural e conservação*, pp. 59–76, São Carlos, Brasil, Editora RiMa.
- ARAUJO, D. S. D., SCARANO, F. R., 2007, "Biogeographic features of *Clusia* with emphasis on South American and especially Brazilian species". In: Lüttge, U. (ed), *Clusia a woody neotropical genus of remarkable plasticity and diversity*, Ecological Studies 194, pp. 31-54, Berlin, Springer-Verlag.

- ARAUJO, D. S. D., SCARANO, F. R., SÁ, C. F. C., KURTZ, B. C., ZALUAR, H. T.L., MONTEZUMA, R. C. M., OLIVEIRA, R. C., 1998, "Comunidades vegetais do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba". In: Esteves, F. A., Lacerda, L. D. (eds), *Ecologia de restingas e lagoas costeiras*, pp. 39–62, Rio de Janeiro, Brasil, Nupem-UFRJ.
- ARMBRUSTER, W. S., 1984, "The role of resin in Angiosperm pollination: ecological and chemical considerations", *American Journal of Botany*, v. 71, pp. 1149–1160.
- ARMBRUSTER, W. S., 1986, "Reproductive interactions between sympatric *Dalechampia* species: Are natural assemblages "random" or organized?" *Ecology*, v. 67, pp. 522–533.
- ARMBRUSTER, W. S., HERZIG, A. L., 1984, "Partitioning and sharing of pollinators by four sympatric species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Panama", *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 71, pp. 1-16.
- ARMBRUSTER, W. S., STEINER, K. E., 1992, "Pollination ecology of four *Dalechampia* species (Euphorbiaceae) in Northern Natal, South Africa", *American Journal of Botany*, v. 79, pp. 306–313.
- ARMBRUSTER, W. S., WEBSTER, G. L., 1979, "Pollination of two species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Mexico by Euglossina bees", *Biotropica*, v. 11, pp. 278–283.
- ARMBRUSTER, W. S., WEBSTER, G. L., 1981, "Sistemas de polinização de duas espécies simpátricas de *Dalechampia* (Euphorbiaceae) no Amazonas, Brasil", *Acta Amazonica*, v. 11, pp. 13–17.

- ARMBRUSTER, W. S., WEBSTER, G. L., 1982, "Divergent pollination systems in sympatric species of South American *Dalechampia* (Euphorbiaceae)", *American Midland Naturalist*, v. 108, pp. 325–337.
- ARMBRUSTER, W. S., WEBSTER, G. L., THOMAS, P. C., 1992, "Pollination of two sympatric species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Suriname by male Euglossina bees", *American Journal of Botany*, v. 79, pp. 1374–1381.
- BAKER, H. G., 1976, "'Mistake" pollination as a reproductive system with special reference to the Caricaceae". In: Burley, J., Styles, B. T. (eds), *Tropical trees: variation, breeding and conservation*, pp. 161–169, London, Academic Press.
- BARBOSA, F. A. R., SCARANO, F. R., SABARÁ, M. G., ESTEVES, F. A., 2004, "Brazilian LTER: Ecosystem and biodiversity information in support of decision-making". *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 90, pp. 121-133.
- BAWA, K. S., 1980, "Evolution of dioecy in flowering plants", *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 11, pp. 15–39.
- BAWA, K. S., OPLER, P. A., 1975, "Dioecism in tropical forest trees", *Evolution*, v. 29, pp. 167–179.
- BIERZYCHUDEK, P., 1981, "Pollination limitation of plant reproductive effort", *American Naturalist*, v. 117, pp. 838–840.
- BIGARELLA, J. J., MOUSINHO, M. R., SILVA, J. X., 1965, "Padiplanos, pedimentos e seus depósitos correlativos no Brasil", *Boletim Paraense de Geografia*, v. 16/17, pp. 117-151.

- BITTRICH, V., AMARAL, M. C. E., 1996a, "Flower morphology and pollination biology of some *Clusia* species from the Gran Sabana (Venezuela)", *Kew Bulletin*, v. 51, pp. 681–694.
- BITTRICH, V., AMARAL, M. C. E., 1996b, "Pollination biology of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae)", *Plant Systematics and Evolution*, v. 200, pp. 101–110.
- BITTRICH, V., AMARAL, M. C. E., 1997, "Flower biology of some *Clusia* species from Central Amazonia", *Kew Bulletin*, v. 52, pp. 617–635.
- BULLOCK, S. H., BAWA, K. S., 1981, "Sexual dimorphism and the annual flowering pattern in *Jacaratia dolichaula* (D. Smith) Woodson (Caricaceae) in a Costa Rican Rain Forest", *Ecology*, v. 62, pp. 1494-1504.
- CALVO, R. N., HORVITZ, C. C., 1990, "Pollination limitation, cost of reproduction, and fitness in plants: a transition-matrix demographic approach" *American Naturalist*, v. 136, pp. 499-516.
- CAMPBELL, D. R., 1989, "Inflorescence size: test of the male function hypothesis", *American Journal of Botany*, v. 76, pp. 730–738.
- CARMO, R. M., FRANCESCHINELLI, E. V., 2002, "Polinização e biologia floral de *Clusia arrudae* Planchon et Triana (*Clusiaceae*) na Serra da Calçada, município de Brumadinho, MG", *Revista Brasileira de Botânica*, v. 25, pp. 351–360.
- CAVERS, S. B., DEGEN, B., CARON, H., LEMES, M. R., MARGIS, R., SALGUEIRO, F., LOWE, A. J., 2005, "Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations", *Heredity*, v. 95, pp. 281–289.

- CEZÁRIO, L. F., 2007, *Recompensas florais e visitantes de duas espécies simpátricas de Clusia, Clusia hilariana Schlttd e Clusia spirito-sanctensis Mariz e Weinberg (Clusiaceae), em áreas de restinga*. Dissertação de M. Sc., UENF, Campos do Goytacazes, Brasil.
- CHUNG, M. G., CHUNG, J. M., EPPERSON, B. K., 1999, "Spatial structure of allozyme polymorphisms within populations of *Rhus trichocarpa* (Anacardiaceae)", *Silvae Genética*, v. 48, pp. 223-227.
- CIRNE, P., SCARANO, F. R., 2001, "Resprouting and growth dynamics after fire of the clonal shrub *Andira legalis* (Leguminosae) in a sandy coastal plain in southeastern Brazil", *Journal of Ecology*, v. 89, pp. 351–357.
- COLES, J. F., FOWLER, D. P., 1976, "Inbreeding in neighbouring trees in two white spruce populations", *Silvae Genética*, v. 25, pp. 29–34.
- CORREIA, C. M. B., 1998, *Estrutura de populações, associação entre quatro espécies-chaves e formação de moitas em restinga de Clusia, no norte fluminense*. Dissertação de M. Sc., UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.
- CORREIA, M. C. R., 1983, *Contribuição ao estudo da biologia floral e do sistema de reprodução de Clusia fluminensis Pl. et Tr. (Guttiferae)*. Dissertação de M. Sc., UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.
- CORREIA, M. C. R., ORMOND, W. T., PIMENTA, M. L., 1989, "Biologia da reprodução de espécies de *Clusia* da Restinga de Maricá – RJ, Brasil". In: *Resumos do XL Congresso Nacional de Botânica*, pp. 100, Cuiabá, Brasil.

- CORREIA, M. C. R., ORMOND, W. T., PINHEIRO, M. C. B., LIMA, H. A., 1993, "Estudos da biologia floral de *Clusia criuva* Camb. um caso de mimetismo", *Bradea*, v. 24, pp. 209–219.
- CORREIA, M. C. R., ORMOND, W. T., PINHEIRO, M. C. B., LIMA, H. A., 1999, "Biologia da reprodução de *Clusia lanceolata* Camb.", *Hoehnea*, v. 26, pp. 61–73.
- CRAWLEY, M. J., 1997, "Sex". In: Crawley, M. J. (ed), *Plant Ecology*, pp. 156–213, Oxford, UK, Blackwell.
- CRUZ, N. D., BOAVENTURA, Y. M., SELLITO, Y. M. 1990, "Citological studies of some species of the genus *Clusia* L. (Guttiferae)", *Brazilian Journal of Genetics*, v. 13, pp. 335-345.
- DAFNI, A., 1984, "Mimicry and deception in pollination", *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 15, pp. 259–278.
- DEGEN, B., PETIT, R., KREMER, A., 2001, "SGS – Spatial genetic software: a computer program for analysis of spatial genetic structures of individuals and populations", *Journal of Heredity*, v. 92, pp. 447–448.
- DEGEN, B., ROUBIK, D. W., 2004, "Effects of animal pollination on pollen dispersal, selfing, and effective population size of tropical trees: a simulation study", *Biotropica*, v. 36, pp. 165-179.
- DIAS, A. T. C., MATTOS, E. A. de, VIEIRA, S. A., AZEREDO, J. V., SCARANO, F. R., 2006, "Aboveground biomass stock of native woodland on a Brazilian sandy coastal plain: estimates based on the dominant tree species", *Forest Ecology and Management*, v. 226, pp. 364-367.

- DIAS, A. T. C., SCARANO, F. R., 2007, "*Clusia* as a nurse plant". In: Lüttge, U. (ed), *Clusia a woody neotropical genus of remarkable plasticity and diversity*, Ecological Studies 194, pp. 55-72, Berlin, Springer-Verlag.
- DIAS, A. T. C., ZALUAR, H. T. L., GANADE, G., SCARANO, F. R., 2005, "Canopy composition influencing plant patch dynamics in a Brazilian sandy coastal plain" *Journal of Tropical Ecology*, v. 21, pp. 343–347.
- DORKEN, M. E., NEVILLE, K. J., ECKERT, C. G., 2004, "Evolutionary vestigialization of sex in a clonal plant: selection versus neutral mutation in geographically peripheral populations", *Proceedings of Royal Society of London*, s. B271, pp. 2375-2380.
- DOYLE, J. J., DOYLE, J. L., 1987, "Isolation of plant DNA from fresh tissue", *Focus*, v. 12, pp. 13-15.
- EPPERSON, B. K., ALVAREZ-BUYLLA, E. R., 1997, "Limited seed dispersal and genetic structure in the life stages of *Cecropia obtusifolia*", *Evolution*, v. 51, pp. 275-282.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E., QUATTRO, J. M., 1992, "Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites", *Genetics*, v. 131, pp. 479-491.
- FARIA, A. P. G. de, MATALLANA, G., WENDT, T., SCARANO, F. R., 2006, "Low fruit set in the abundant dioecious tree *Clusia hilariana* (*Clusiaceae*) in a Brazilian restinga", *Flora*, v. 201, pp. 606-611.
- FIDERJ, 1978, *Indicadores climatológicos: sistema de informação para o planejamento estadual*. Rio de Janeiro, Brasil, SECPLAN.

- FRANCO, A. C., NOBEL, P. S., 1989, "Effects of nurse plants on the microhabitat and growth of cacti", *Journal of ecology*, v. 77, pp. 870-886.
- FREEMAN, D. C., DOUST, J. L., EI-KEBLAWY, A., MIGLIA, K. J., MCARTHUR, E. D., 1997, "Sexual specialization and inbreeding avoidance in the evolution of dioecy", *Botanical Review*, v. 63, pp. 65–92.
- FREEMAN, D. C., KLIKOFF, L. G., HARPER, K. T., 1976, "Differential resource utilization by the sexes of dioecious plants", *Science*, v. 193, pp. 597–599.
- FREIRE, M. S. B., 1990, "Levantamento florístico do Parque Estadual das dunas de Natal", *Acta Botânica Brasileira*, v. 4, pp. 41-59.
- GUITIAN, J., 1993, "Why *Prunus mahaleb* (Rosaceae) produces more flowers than fruits", *American Journal of Botany*, v. 80, pp. 1305-1309.
- GUSTAFSSON, M. H. G., 2000, "Floral morphology and relationships of *Clusia gundlachii* with a discussion of floral organ identity and diversity in the genus *Clusia*", *International Journal of Plant Science*, v. 161, pp. 43–53.
- GUSTAFSSON, M. H. G., BITTRICH, V., STEVENS, P.F., 2002, "Phylogeny of *Clusiaceae* based on *rbcl* sequences", *International Journal of Plant Science*, v.163, pp. 1045–1054.
- GUSTAFSSON, M. H. G., WINTER, K., BITTRICH, V., 2007, "Diversity, phylogeny and classification of *Clusia*". In: Lüttge, U. (ed), *Clusia a woody neotropical genus of remarkable plasticity and diversity*, Ecological Studies 194, pp. 95-116, Berlin, Springer-Verlag.

- HALE, M. L., SQUIRRELL, J., BORLAND, A. M., WOLFF, K., 2002,. "Isolation of polymorphic microsatellite loci in the genus *Clusia* (*Clusiaceae*)", *Molecular Ecology Notes*, v. 2, pp. 506–508.
- HAMMEL, B., 1986, "New species of *Clusiaceae* form Central America with notes on *Clusia* and synonymy in the tribe Clusiae", *Selbyana*, v. 9, pp. 112–120.
- HAMRICK, J. L., GODT, M. J. W., SHERMAN-BROYLES, S., 1992, "Factors influencing levels of genetic diversity in wood plant species", *New Forest*, v. 6, pp. 95-124.
- HAMRICK, J. L., MURAWSKY, D. A., NASON, J. D., 1993, "The influence of seed dispersal mechanism on the genetic structure of tropical tree populations", *Vegetatio*, v. 107/108, pp. 281-297.
- HENRIQUES, R. P. B., ARAUJO, D. S. D., HAY, J. D., 1986, "Descrição e classificação dos tipos de vegetação da restinga de Carapebus, Rio de Janeiro", *Revista Brasileira de Botânica*, v. 9, pp. 173–189.
- JANZEN, D. H., 1971, "Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants", *Science*, v. 171, pp. 203–205.
- JANZEN, D. H., 1975, *Ecology of plants in the tropics*. London, UK, Edward Arnold.
- KEARNS, C. A., INOUE, D. W., 1993, *Techniques for pollination biologists*. Niwot, University Press of Colorado.
- KREBS, C. J., 1999, *Ecological Methodology*. 2 ed. Menlo Park, California, Benjamin-Cummins.

- KREMER, A., CARON, H., CAVERS, S., COLPAERT, N., GHEYSEN, L., GRIBEL, R., LEMES, M. R., LOWE, A., MARGIS, R., NAVARRO, C., SALGUEIRO, F., 2005, "Monitoring genetic diversity in tropical trees with multilocus dominant markers", *Heredity*, v. 95, pp. 274-280.
- KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M., 2004, "MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment", *Briefings in Bioinformatics*, v. 5, pp. 150-163.
- LAMBERGE, M., PAYETTE, S., BOUSQUET, J., 2000, "Life span and biomass allocation of stunted black spruce clones in the subarctic environment", *Journal of Ecology*, v. 88, pp. 584-593.
- LIEBIG, M., SCARANO, F. R., MATTOS, E. A. de, ZALUAR, H. L. T., LÜTTGE, U., 2001, "Ecophysiological and floristic implications of sex expression in the dioecious neotropical CAM tree *Clusia hilariana* Schlttdl", *Trees*, v. 15, pp. 278–288.
- LITTLE, R. J., 1983, "A review of floral food deception mimicries with comments on floral mutualism". In: Jones, C. E., Little, R. J. (eds), *Handbook of experimental pollination biology*, pp. 294–309, New York, Scientific and Academic Editions.
- LLOYD, D. G., WEBB, C. J. 1997, "Secondary sex characters in plants". *Botanical Review*, v. 42, pp. 177-216.
- LOKVAM, J., BRADOCK, J. F., 1999, "Anti-bacterial function in the sexually dimorphic pollinator rewards of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae)", *Oecologia*, v. 119, pp. 534–540.

- LOPES, A. V., MACHADO, I. C., 1998, "Floral biology and reproductive ecology of *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) in northeastern Brazil", *Plant Systematics and Evolution*, v. 213, pp. 71–90.
- LOVELESS, M. D., HAMRICK, J. L., 1984, "Ecological determinants of genetic structure in plant populations", *HAnnual review of ecology and systematics*, v. 15, pp. 65-95.
- LOVELESS, M. D., HAMRICK, J. L., FOSTER, R.B., 1998, "Population structure and mating in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree", *Heredity*, v. 81, pp. 134-143.
- LYNCH, M., MILLIGAN, B.G., 1994, "Analysis of population genetic-structure with RAPD markers", *Molecular Ecology*, v. 3, pp. 91-99.
- MACEDO, M. V., MONTEIRO, R. F., 1987, "Germinação e desenvolvimento de plântulas em tanque de *Neoregelia cruenta* (Bromeliaceae) na Restinga de Barra de Maricá, RJ". In: *Simpósio sobre Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira*, pp. 188-190, Cananéia, Brasil.
- MARGIS, R., FELIX, D., CALDAS, J. F., SALGUEIRO, F., ARAUJO, D. S. D., BREYNE, P., VAN MONTAGU, M., OLIVEIRA D., MARGIS-PINHEIRO, M., 2002, "Genetic differentiation among three neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest", *Biodiversity and Conservation*, v. 11, pp. 149–163.
- MCLAUGHLIN, M. E., FRIAR, E. A., 2007, "Clonality in the endangered *Ambrosia pumila* (Asteraceae) inferred from RAPD markers; implications for conservation and management", *Conservation Genetics*, v. 8, pp. 319-330.

- MAGUIRE, B., 1976, "Apomixis in the genus *Clusia* (*Clusiaceae*). A preliminary report", *Taxon*, v. 25, pp. 241–244.
- MARTIN, F., 1959, "Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence", *Stain Technology*, v. 34, pp. 125.
- MARTINS, R. L., OLIVEIRA, P. E. A. M., 2003, "RAPD evidence for apomixis and clonal population in *Eriotheca* (*Bombacaceae*)", *Plant Biology*, v. 5, pp. 338–340.
- MARTINS, R. L., WENDT, T., MARGIS, R., SCARANO, F. R., 2007, "Reproductive Biology". In: Lüttge, U. (ed), *Clusia a woody neotropical genus of remarkable plasticity and diversity*, Ecological Studies 194, pp. 73-94, Berlin, Springer-Verlag.
- MATALLANA, G., WENDT, T., ARAUJO, D. S. D., SCARANO, F. R., 2005, "High abundance of dioecious plants in a tropical coastal vegetation", *American Journal of Botany*, v. 92, pp. 1513–1519.
- MAYR, E., 1963, *Animal species and evolution*. Cambridge, UK, Belknap Press.
- MEAGHER, T. R., ANTONOVICS, J., 1982, "The population biology of *Chamaelirium luteum*, a dioecious member of the lily family: life history studies", *Ecology*, v. 63, pp. 1690-1700.
- MESQUITA, R. C. G., FRANCISCON, C. H., 1995, "Flower visitors of *Clusia nemorosa* G.F.W. Meyer (*Clusiaceae*) in an Amazonian White-Sand Campina", *Biotropica*, v. 27, pp. 245-257.

- METCALFE, W. S., ELLISON, A. M., BERTNESS, M. D., 1986, "Survivorship and spatial development of *Spartina alterniflora* Loisel. (Gramineae) seedlings in a New England Salt Marsh", *Annals of Botany*, v. 58, pp. 249-258.
- MILLER, M. P., 1997, *Tools for population genetics analyses (TFPGA): A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data*. On-line: <http://herb.bio.nau.edu/~miller/tfpga.htm>.
- MORAES, M. L. T., KAGEYAMA, P. Y., SEBBENN, A. M., 2005, "Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. Sob diferentes condições antrópica", *Revista Árvore*, v. 29, n.2, pp. 281-289.
- MORISITA, M., 1959, "Measuring of the dispersion of individuals and analyses of the distributional patterns". In: *Memoirs of the Faculty of Science, Kyushu University*, Series E: Biology, n. 2, Kyushu University Press, pp. 215-235.
- MYERS, J. H., 1978, 'Selecting a measure of dispersion', *Environmental Entomologist*, v. 7, pp. 619-621.
- NEI, M., 1978, "Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals". *Genetics*, v. 89, pp. 538-590.
- NEI, M., 2005, "Bottlenecks, genetic polymorphism and speciation", *Genetics*, v. 170, pp. 1-4.
- NEI, M., MARUYAMA, T., CHAKRABORTY, R., 1975, "The bottleneck effect and genetic variability in populations", *Evolution*, v. 29, pp. 5-8.

- NEI, M., GRAUR, D., 1984, "Extent of protein polymorphism and the neutral mutation theory", *Evolutionary Biology*, v. 17, pp. 73-118.
- NEILAND, M. R. M., WILCOCK, C. C., 1998, "Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae", *American Journal of Botany*, v. 85, pp. 1657-1671.
- NICOTRA, A. B., 1998, "Sex ratio variation and spatial distribution of *Siparuna grandiflora*, a tropical dioecious shrub", *Oecologia*, v. 115, pp. 102-113.
- NYBOM, H., 2004, "Comparisson of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants", *Molecular Ecology*, v. 13, pp. 1143-1155.
- OPLER, P. A., BAWA, K. S., 1978, "Sex ratios in tropical forest trees", *Evolution*, v. 32, pp. 812-821.
- ORMOND, W. T., PINHEIRO, M. C. B., de LIMA, H. A., CORREIA, M. C. R., PIMENTA, M. L., 1993, "Estudo das recompensas florais das plantas da restinga de Maricá – Itaipuaçu, RJ. I – Nectaríferas", *Bradea*, v. 6, pp. 179-195.
- PASSOS, L., OLIVEIRA, P. S., 2002. "Ants affect the distribution and performance of seedlings of *Clusia criuva*, a primary bird-dispersed rain forest tree", *Journal of Ecology*, v. 90, pp. 517-528.
- PIMENTEL, M. C. P., BARROS, M. J., CIRNE, P., de MATTOS, E. A., OLIVEIRA, R. C., PEREIRA, M. C. A., SCARANO, F. R., ZALUAR, H. L. T., ARAUJO, D. S. D., 2007, "Spatial variation in the structure and floristic composition of restinga vegetation in southeastern Brazil", *Revista Brasileira de Botânica*, (no prelo).

- PIPOLY, J. J., KEARNS, D. M., BERRY, P. E., 1998, "*Clusia*". In: Berry, P.E., Holst, B.K., Steyermark, J.A., Yatkivych, K. (eds), *Flora of the Venezuelan Guayana*; v. 4, Caesalpiniaceae – Ericaceae, pp. 248-295, St Louis, Missouri, Missouri Botanical Garden Press.
- RAMÍREZ, W., GÓMEZ, L. D., 1978, "Production of nectar and gums by flowers of *Monstera deliciosa* (Araceae) and some species of *Clusia* (Guttiferae) collected by New World Trigona bees", *Brenesia*, v. 14/15, pp. 407–412.
- RENNER, S. S., 2005, "Rewardless flowers in the angiosperms and the role of insect cognition in their evolution". In: Waser, N. M., Ollerton, J. (eds), *Plant-Pollinator Interactions: From Specialization to Generalization*, pp. 123–144, Chicago, University of Chicago Press.
- RENNER, S. S., RICKLEFS, R. E., 1995, "Dioecy and its correlates in the flowering plants", *American Journal of Botany*, v. 82, pp. 596–606.
- ROUBIK, D. W., 1992, *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge, UK, Cambridge University Press.
- ROY, B. A., WIDMER, A., 1999, "Floral mimicry: a fascinating yet poorly understood phenomenon", *Trends in Plant Science*, v. 4, pp. 325-330.
- SAKAGAMI, S. F., INOUE, J., YAMANE, S., SALMAH, S., 1989, "Nests of the myrmecophilous stingless bee *Trigona moorei*: how do bees initiate their nest within and arboreal ant nest?", *Biotropica*, v. 21, pp. 256–274.
- SAMPAIO, M. C., PICÓ, F. X., SCARANO, F. R., 2005, "Ramet demography of a nurse bromeliad in Brazilian restingas", *American Journal of Botany*, v. 92, pp. 674-681.

- SCARANO, F. R., 2002, "Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic rain forest", *Annals of Botany*, v. 90, pp. 517–524.
- SCARANO, F. R., CIRNE, P., NASCIMENTO, M. T., SAMPAIO, M. C., VILLELA, D., WENDT, T., ZALUAR, H. L. T., 2004, "Ecologia Vegetal: integrando ecossistema, comunidades, populações e organismo". In: Rocha, C. F. D., Esteves, F. A., Scarano, F. R. (eds), *Pesquisas de Longa Duração na Restinga de Jurubatiba: Ecologia, História Natural e Conservação*, pp. 77-97, São Carlos, Brasil, RiMa.
- SCARANO, F. R., DUARTE, H. M., FRANCO, A. C., GEßLER, A., de MATTOS, E. A., NAHM, M., RENNENBERG, H., ZALUAR, H. L. T., LÜTTGE, U., 2005, "Ecophysiology of selected tree species in different plant communities at the periphery of the Atlantic Forest of SE-Brazil I. Performance of three different species of *Clusia* in an array of plant communities", *Trees*, v. 19, pp. 497–509.
- SCHNEIDER, S., ROESSLI, D., EXCOFFIER, L., 2000, *Arlequin ver. 2000: a software for population genetics and biometry laboratory*. Switzerland, University of Geneva.
- SEBBENN, A. M., KAGEYAMA, P.Y., VENCOSVKY, R., 1998, "Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética espacial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos", *Scientia Forestalis*, v. 53, pp. 15-30.
- SKUTCH, A. F., 1971, *A naturalist in Costa Rica*. Gainesville, USA, University of Florida Press.
- SLATKIN, M., 1977, "Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinctions", *Theoretical Population Biology*, v. 12, pp. 253-262.

- STEINER, K. E., 1998, "The evolution of beetle pollination in a South African orchid", *American Journal of Botany*, v. 85, pp. 1180–1193.
- STEPHESON, A. G., 1979, "An evolutionary examination of the floral display of *Catalpa speciosa* (Bignoniaceae)", *Evolution*, v. 33, 1200–1209.
- STEPHESON, A. G., 1981, "Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate function", *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.12, 253–279.
- STEPHESON, A. G., WINDSOR, J. A., 1986, "Lotus corniculatus regulate offspring quality through selective fruit abortion", *Evolution*, v. 40, pp. 453–458.
- SUGUIO, K., TESSLER, M. G., 1984, "Planícies de cordões litorâneos quaternários do Brasil: origem e nomenclatura". In: Lacerda, L. D., Araujo, D. S. D., Cerqueira, R., Turcq, B. (eds), *Restingas: origem, estrutura e processos*, pp. 15-26, Niterói, Brasil, CEUFF.
- SUGIYAMA, M., 1998, "Estudos de florestas da restinga da Ilha do Cardoso, Cananéia, São Paulo, Brasil", *Boletim do Instituto de Botânica*, v. 11, pp. 119-159.
- SUTHERLAND, S., 1987, "Why hermaphroditic plants produce many more flowers than fruits: experimental tests with *Agave mckelveyana*", *Evolution*, v. 41, pp. 750–759.
- SUTHERLAND, S., DELPH, L. F., 1984, "On the importance of male fitness in plants: patterns of fruit-set", *Ecology*, v. 65, pp. 1093–1104.
- TAKEUCHI, Y., ICHIKAWA, S., KONUMA, A., TOMARU, N., NIIYAMA, K., LEE, S. L., MUHAMMAD, N., TSUMURA, Y. 2004, "Comparison of the fine-scale genetic structure of three dipterocarp species", *Heredity*, v. 92, pp. 323-328.

- THOMPSON, D. I., BARRET, S. C. H., 1981, "Selection of outcrossing, sexual selection, and evolution of dioecy in plants", *American Naturalist*, v. 118, pp. 443-449.
- THOMPSON, D. I., EDWARDS, T. J., 2001, "Breeding biology, resource partitioning and reproductive effort of a dioecious shrub, *Clusia pulchella* L. (Euphorbiaceae)", *Plant Systematics and Evolution*, v. 226, pp. 13–22.
- THOMSON, J. D., BRUNET, J., 1990, "Hypotheses for the evolution of dioecy in seed plants", *Tree*, v. 5, pp. 11–16.
- TSUJI, K., TSUJI, N., 1998, "Indices of reproductive skew depend on average reproductive success", *Evolutionary Ecology*, v. 12, pp. 141-152.
- UPTON, G. J. G., FINGLETON, B., 1985, *Spatial data: analysis by example*, v. 1. New York, John Wiley and Sons.
- VAASEN, A., BEGEROW, D., LÜTTGE, U., HAMPP, R. 2002, "The genus *Clusia* L.: molecular evidence for independent evolution of photosynthetic flexibility", *Plant biology*, v. 4, pp. 86-93.
- VEKEMANS, X., HARDY, O. J., 2004, "New insights from fine scale spatial genetic structure analyses in plant population", *Molecular ecology*, v. 13, pp. 912-935.
- VICENTINI, A., FISCHER, E. A., 1999. "Pollination of *Moronobea coccinea* (Clusiaceae) by the golden-winged parakeet in the Central Amazon", *Biotropica*, v. 31, pp. 692–696.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DELEE, T., HOMES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M., 1995, "AFLP – a

new technique for DNA – fingerprinting”, *Nucleic Acid Research*, v. 23, pp. 4407-4414.

WAKE, D. B., 1991, “Homoplasy: The Result of Natural Selection, or Evidence of Design Limitations?”, *American Naturalist*, v. 138, 543–567.

WIENS, D., 1978, “Mimicry in plants”. In: Hecht, M. K., Steere, W. C., Wallace, B. (eds), *Evolutionary Biology*, v.11. pp. 365-496, New York, Plenum Publishing.

WRIGTH, S., 1965, “The interpretation of population structure by F-statistics with especial regard to systems of mating”, *Evolution*, v. 19, pp. 395-420.

ZALUAR, H. T. L., 2002, *Dinâmica da vegetação em restingas abertas fluminenses: uma aproximação através da interação entre plantas*. Tese de D. Sc., UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

ZALUAR, H. T. L., SCARANO, F. R., 2000, “Facilitação em restingas de moitas: um século de buscas por espécies focais”. In: Esteves, F.A., Lacerda, L.D. (eds), *Ecologia de restingas e lagoas costeiras*, pp. 3-23, Rio de Janeiro, Nupem-UFRJ.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)