

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

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE TRÊS ESPÉCIES DE *Retiniphyllum* Bonpl.
(RUBIACEAE) EM VEGETAÇÃO DE CAMPINARANA NA AMAZÔNIA CENTRAL**

MAYÁ REGINA MÜLLER SCHWADE

Manaus, Amazonas

Junho, 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MAYÁ REGINA MÜLLER SCHWADE

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE TRÊS ESPÉCIES DE *Retiniphyllum* Bonpl.
(RUBIACEAE) EM VEGETAÇÃO DE CAMPINARANA NA AMAZÔNIA CENTRAL**

ORIENTADOR: Dr. Rogério Gribel S. Neto

CO-ORIENTADOR: Dr. Antonio Carlos Webber

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em BOTÂNICA.

MANAUS, Amazonas

Junho, 2010

S398

Schwade, Mayá Regina Müller

Biologia reprodutiva de três espécies de *Retiniphyllum* Bonpl. (Rubiaceae) em vegetação de campinarana na Amazônia Central / Mayá Regina Müller Schwade. --- Manaus : [s.n.], 2010. xiii, 55 f. : il. color.

Dissertação (mestrado)-- INPA, Manaus, 2010

Orientador : Rogério Gribel S. Neto

Co-orientador : Antonio Carlos Webber

Área de concentração : Botânica

1. *Retiniphyllum*. 2. Fenologia. 3. Isolamento reprodutivo. 4. Simpatria. 5. Ecologia da polinização. I. Título.

CDD 19. ed. 583.52045

Foi estudada a biologia reprodutiva de três espécies pertencentes a *Retiniphyllum*, (Rubiaceae), que ocorrem em campinas e campinaranas no município de Presidente Figueiredo, Amazonas. Foram avaliados as características florais, os polinizadores, sistema e isolamento reprodutivos.

Palavras-chave: *Retiniphyllum*, autocompatibilidade, apomixia, cruzamentos interespecíficos, simpatria, espécies congênicas.

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar, a minha mãe, Doroti Alice Müller Schwade, por sua dedicação, suporte e amor em todos os momentos.

A meu pai, Egydio Schwade, incentivador e cooperador nas pesquisas.

A Angelo Ricardo Sousa Chaves, pelo carinho e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA.

A Coordenação de Pesquisa em Botânica, CPBO, e a Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Botânica, especialmente à Maria Lúcia Absy, às secretárias, Neide, Gisele e Jéssica, pelo suporte no andamento da pesquisa.

Ao CNPq, pelo financiamento da bolsa de mestrado.

Ao Dr. Rogério Gribel, pela orientação, principalmente pelas conversas iluminadoras.

Ao Dr. Antonio Carlos Webber, pela co-orientação, amizade e disponibilização de materiais e equipamentos fundamentais a realização desta pesquisa.

Aos meus irmãos, Luiz Augusto, Tiago Maiká e Maurício Adu Schwade, meus pais Egydio Schwade e Doroti A. M. Schwade e à família Souza Chaves, pela paciência, apoio e auxílio seguro nas excursões para coleta de dados.

Aos colegas de mestrado, André e Amanda, pelo companheirismo, pelas discussões produtivas e pela ajuda em campo. Aos demais colegas e amigos do mestrado, pelo companheirismo.

Ao Sr. José Bráulio Pinto, pela permissão da realização de parte desta pesquisa em sua propriedade particular.

Ao Sr. Francisco Lima, pela permissão do repouso em sua casa durante o campo e auxílio nas tarefas cotidianas.

A equipe do Laboratório de Polinização do INPA, Aldenora, Gloria e Marcelo, pela ajuda em campo. Ao Sr. Ananias da Silva Corrêa, à Josefina Fridericha e a Luiza Souza Cardoso, e a Inka ... pela companhia em campo.

À Dra. Rócio Cortés-B, especialista no gênero *Retiniphyllum*, pela confirmação da identificação das espécies deste estudo.

Ao Dr. Márcio Oliveira, pela identificação das espécies de abelhas visitantes florais.

Ao Dr. Mário Cohn-Haft, pela identificação das espécies de beija-flores visitantes florais.

Ao Dr. Antônio Manzi e sua equipe do programa LBA-INPA, pela disponibilidade dos dados pluviométricos dos meses de 2009.

Ao Sr. Edson Lira, pelo auxílio na análise dos dados.

Finalmente, a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

“Quando tentamos considerar algo por si mesmo, descobrimos que esse algo se acha atado por milhares de fios invisíveis e inquebráveis a tudo o mais no universo.”

John Muir
VII

RESUMO

A família Rubiaceae é bem representada no sub-bosque das regiões tropicais, influenciando a dinâmica ecológica de muitos ambientes porque tem flores e frutos que atraem uma série de visitantes florais e dispersores de sementes, que dependem desses recursos. Algumas espécies congênicas podem ocorrer em simpatria, permitindo estudos comparativos sobre a biologia floral e reprodutiva, bem como sobre o isolamento reprodutivo, contribuindo para a compreensão das questões evolutivas relacionadas à sua coexistência. No município de Presidente Figueiredo, Amazonas, pelo menos quatro espécies simpátricas do gênero *Retiniphyllum* ocorrem na vegetação de campinarana. O objetivo deste estudo foi identificar a ocorrência de mecanismos pré-zigóticos de isolamento reprodutivo entre três delas (*R. concolor*, *R. schomburgkii* e *R. speciosum*), através da comparação da fenologia reprodutiva, biologia floral, polinização e sistema reprodutivo. As três espécies florescem anualmente, produzindo flores durante vários meses. O pico de floração de *R. concolor* e *R. schomburgkii* coincidiu com o período mais seco e apenas um episódio curto de floração coincidiu com as chuvas na região. *Retiniphyllum speciosum* apresentou três picos principais de floração, todos no período de baixa precipitação. Existe uma grande sobreposição na produção de flores das três espécies. *R. schomburgkii* apresentou maior sincronização no florescimento. As flores das três espécies ocorrem em inflorescências, são tubulares e tem lacínios livres. O tamanho e cor das flores diferiu entre as três espécies. O início da antese pode ocorrer durante qualquer hora do dia, podendo durar de três a sete dias, dependendo da espécie. No final da abertura da flor, o pólen é depositado sobre o estigma, cujos lobos ainda estão fechados. O estigma começa a ser receptivo a partir do segundo dia após o início da antese. A produção de néctar começa antes da abertura das flores. As flores de *R. concolor* e *R. schomburgkii* liberam um perfume agradável e doce. Houve compartilhamento de visitantes entre as três espécies, mas a eficácia das visitas diferiu dependendo da espécie visitada. *R. concolor* foi visitado apenas por abelhas; *R. speciosum* por abelhas e beija-flores; e *R. schomburgkii* por abelhas, borboletas, mariposas e beija-flores. Fêmeas de *Euglossa* sp.2 visitaram as flores das três, sendo as polinizadoras potenciais de *R. concolor* e *R. schomburgkii*. O beija-flor *Phaethornis ruber* visitou as flores de *R. schomburgkii* e *R. speciosum*, mas foi considerado o polinizador efetivo da segunda espécie apenas. As três espécies são auto-compatíveis e apresentam altas taxas de frutificação em condições naturais. *R. speciosum* foi a única espécie que apresentou produção de frutos por apomixia. Observou-se a formação de frutos e sementes em todos os cruzamentos interespecíficos. No entanto, híbridos naturais dessas espécies não foram encontrados na natureza. Os resultados indicam que as três espécies de *Retiniphyllum* não têm barreiras pré-zigóticas eficientes, produzindo frutos em polinizações interespecíficas experimentais. É provável que o seu desenvolvimento possa ser limitado durante os estádios pós-zigóticos, como a formação de embriões viáveis, a germinação ou desenvolvimento das plântulas.

ABSTRACT

The family Rubiaceae is represented in the understory of tropical forests, influencing the ecological dynamics of many environments because its flowers and fruits that attract a number of flower visitors and seed dispersers, that depend on these resources. Some species may occur in sympatry, allowing comparative studies of the floral and reproductive biology, as well as reproductive isolation and contribute to the understanding of evolutionary questions related to the co-existence of these species. In the municipality of Presidente Figueiredo, Amazonas, at least four sympatric species of the genus *Retiniphyllum* occur in the campinarana vegetation. The aim of this study was to identify the occurrence of pre-zygotic mechanisms of reproductive isolation among three species of *Retiniphyllum* (*R. concolor*, *R. schomburgkii*, and *R. speciosum*) in this area through the comparison of reproductive phenology, floral biology, pollination and reproductive system. The three species bloom annually, producing flowers for several months. The flowering peak of *R. concolor* and *R. schomburgkii* coincided with the driest period and only a short episode of flowering coincided with the rainfall. *R. speciosum* showed three main peaks of flowering, all in period of low rainfall. There is a large overlap in the production of flowers of the three species. *R. schomburgkii* showed greater synchronization in flowering. Despite the fruit production has been almost continuous, *R. schomburgkii* showed a decline in the months of September to November, possibly due to a drop in the number of flower visitors observed during these months. The flowers of the three species occur in inflorescences and are tubular. The color and size of floral components differed among the three species. The beginning of anthesis may occur during any time of day and can last from three to seven days, depending on species. At the end of the opening process, pollen is deposited on the stigma, where lobules are still closed. The stigma is beginning to be receptive from the second day. The nectar production starts before the opening of the flowers. The flowers of *R. concolor* and *R. schomburgkii* release a pleasant and sweet fragrance. There was sharing of floral visitors between the three species, but the pollination effectiveness differs depending on the species visited. *R. concolor* was visited only by bees, *R. speciosum* by bees and hummingbirds, while *R. schomburgkii* by bees, butterflies, moths and hummingbirds. Females *Euglossa* sp. visited the flowers of three species of *Retiniphyllum*, being the potential pollinators of *R. concolor* and *R. schomburgkii*. The hummingbird *Phaethornis ruber* visited the flowers of *R. schomburgkii* and *R. speciosum*, but was considered the effective pollinator of the latter only. The three species are self-compatible and have high rates of fruit set under natural conditions. *R. speciosum* was the only species that showed production of fruits for apomixis. It was observed formation of fruits in all inter-specific crosses. However, natural hybrids of these species were not found in nature. From these results, we concluded that the three species of *Retiniphyllum*, have no efficient pre-zygotic barriers, producing fruits in interspecific experimental pollinations. As hybrid adults were not found in nature, it is likely that its development may be limited during the post-zygotic stages, such as the formation of viable embryos, germination or seedling development.

SUMÁRIO

Resumo	VIII
Abstract.....	IX
Introdução.....	1
Revisão Bibliográfica	3
Objetivos	7
Material e Métodos	8
Resultados	16
Discussão	36
Conclusão	44
Referências Bibliográficas	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características florais de <i>Retiniphyllum concolor</i> , <i>R. schomburgkii</i> e <i>R. speciosum</i>	22
Tabela 2. Visitantes florais de <i>Retiniphyllum concolor</i> , <i>R. schomburgkii</i> e <i>R. speciosum</i> . Papel na polinização: PP = polinizador potencial; PE = polinizador eventual; CP = coletor de pólen; CN = coletor de néctar; (-) visitante não observado.	27
Tabela 3. Frequência de visitantes em <i>Retiniphyllum schomburgkii</i> . F = frequente; PF = pouco frequente; (uma visita a cada turno de observação); R = raro (uma a cinco visitas durante todo o período de observações).....	29
Tabela 4. Frequência de visitantes em <i>Retiniphyllum speciosum</i> . F = frequente; R = raro (uma a cinco visitas durante todo o período de observações.	30
Tabela 5. Produção de frutos por <i>Retiniphyllum concolor</i> , <i>R. schomburgkii</i> e <i>R. speciosum</i> ..	32
Tabela 6. Razão pólen/óvulo para <i>Retiniphyllum concolor</i> , <i>R. schomburgkii</i> e <i>R. speciosum</i>	34
Tabela 7. Produção de frutos após polinizações experimentais híbridas com <i>Retiniphyllum</i> <i>concolor</i> , <i>R. schomburgkii</i> e <i>R. speciosum</i> . Entre parenteses, ao lado dos valores de porcentagem nos cruzamentos em que <i>R. speciosum</i> , é receptor, destaca-se valores sem a taxa de agamospermia.....	35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Quantidade de chuvas nos meses de 2009. FONTE: Programa LBA/INPA – torre de coleta K34, na Reserva Cuieiras, do INPA, localizada cerca de 60 Km ao norte de Manaus, nas coordenadas geográficas S 2°36'32,67", W 60°12'33,48 10
- Figura 2.** Fenologia reprodutiva de 10 indivíduos de *Retiniphyllum concolor*, *R. schomburgkii* e *R. speciosum*, onde (—) é percentual de intensidade de Fournier e (•••) índice de atividade 19
- Figura 3.** Inflorescências das espécies estudadas. A e B: *Retiniphyllum concolor*; C e D: *R. schomburgkii*; E e F: *R. speciosum*. Detalhe das figuras A e B indicam a evolução da abertura das flores nas inflorescências 1
- Figura 4.** Padrão de coloração. A: *Retiniphyllum concolor*; B: *R. schomburgkii*; C: *R. speciosum*. Setas (em A e B) indicam as regiões com aparência de guias de néctar e círculo indica depósito de pólen no estigma, no momento da abertura floral (apresentação secundária de pólen estilar) 12
- Figura 5.** A: flor de *Retiniphyllum schomburgkii*; B: flor de *R. concolor*; C: flor de *R. speciosum* 23
- Figura 6.** Gráficos mostrando a produção de néctar. A linha escura representa o volume (eixo da esquerda) e a clara, a % de açúcares totais presentes no néctar (eixo da direita) 25
- Figura 7.** Frutos. A: *Retiniphyllum concolor*; B: *R. schomburgkii*; C: *R. speciosum*. 16

Figura 8. Visitantes florais. A: *Centris* sp., potencial polinizador de *Retiniphyllum schomburgkii*; B: Borboleta não identificada sp.1 – polinizador eventual de *R. schomburgkii*, notar que frequentemente o estigma não é tocado; C: Visita de *Euglossa* sp.2, principal polinizador de *R. concolor*; D: *Phaethornis ruber*, polinizador efetivo de *R. speciosum*; E: *P. superciliosus*, polinizador efetivo de *R. speciosum*; F: *Euglossa* sp.2, coletando néctar em *R. speciosum* – a espécie é visitante frequente das três espécies estudadas..... 27

Figura 9. Plântula híbrida do cruzamento entre *R. concolor* e *R. speciosum*, com quatro dias. Em destaque, seta indicando a testa da semente envolvendo os cotilédones.....36

1. INTRODUÇÃO

A família Rubiaceae é considerada uma das maiores e mais diversas famílias dentre as Angiospermas, com cerca de 650 gêneros e 13.000 espécies (Delprete e Cortés-B, 2004), a maior parte delas com distribuição tropical (Motley *et al.*, 2005). Com relação às características florais e reprodutivas, as Rubiaceae representam uma família com grande atratividade, pelo grande número de espécies dependentes da polinização por animais e também por apresentarem estratégias reprodutivas complexas.

A tribo Retiniphyllae, incluída na subfamília Ixoroideae, possui um único gênero, *Retiniphyllum* Bonpl., composto por 22 espécies de árvores e arbustos, com ocorrência em solos de areia branca, principalmente na região da Guiana, mas também na Bacia Amazônica, leste dos Andes e centro e leste do Brasil (Cortés-B *et al.*, 2009). Os representantes deste gênero são monomórficos e possuem como característica marcante da sua biologia reprodutiva a apresentação secundária de pólen (ASP) e a protandria.

A reprodução das plantas ocorre principalmente de modo biparental, com dois indivíduos atuando como doadores de material genético (Richards, 1997; Judd *et al.*, 2009). Porém, muitas espécies podem se reproduzir de forma uniparental (Allem, 2004). Entre os evolucionistas, predomina a ideia de que a variabilidade genética favorecida com os cruzamentos entre diferentes indivíduos seja um fator fundamental para a continuidade da existência dos organismos e da evolução, mas um desafio a esta abordagem é a descoberta de que cerca de um terço de todas as espécies conhecidas de plantas com flores são autopolinizadas (Allard, 1975; Allem, 2004). Outra forma de reprodução encontrada em um significativo número de espécies em diferentes famílias de Angiospermas é a apomixia (Naumova, 2008), caracterizada pela formação de frutos e sementes sem a presença do pólen. Porém, cerca de um terço das espécies que apresenta formação de fruto desta forma também realiza a reprodução sexual (anfimixia) em um mesmo indivíduo (Judd *et al.*, 2009), sendo raras as espécies que podem ser consideradas apomíticas obrigatórias (Naumova, 2008).

A co-existência de espécies relacionadas evolutivamente requer a existência de barreiras reprodutivas entre elas. Espécies congênicas e simpátricas, estão, desta forma, impedidas de livre troca de genes por barreiras reprodutivas que operam prioritariamente na polinização, entre a polinização e a fertilização e depois da fertilização (Levin, 1971). Uma forma de investigação sobre a existência de compatibilidade pré-emergente pode ser realizada através de polinizações interespecíficas controladas.

Por causa da ocorrência de espécies congênicas e simpátricas, da complexidade das interações plantas-polinizadores, entre outros fatores, as relações encontradas nas florestas úmidas oferecem oportunidade para pesquisas sobre processos evolutivos e ecológicos nas plantas (Bawa, 1990). Determinar quais dos potenciais mecanismos de isolamento reprodutivo são efetivos no impedimento de fluxo gênico entre espécies de plantas congênicas é importante para entender o direcionamento evolutivo destas (Bower, 1996; Wilbert *et al.*, 1997; Wendt *et al.*, 2002; Colaço *et al.*, 2006; Lowe e Abbot, 2004; Pascarella, 2007).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Visitantes e polinizadores

Muitas espécies de plantas dependem da polinização por animais para a reprodução, como indicado em vários trabalhos de biologia reprodutiva conduzidos em diferentes ambientes. Essa dependência pode levar ao desenvolvimento de uma seleção direcional das plantas para um complexo de fenótipos aumentando seu sucesso reprodutivo (Galliot *et al.*, 2006). A preferência diferencial por algumas espécies de polinizadores por indivíduos de uma mesma população pode criar uma covariância entre os fenótipos de plantas e aptidão das flores que exerce influência na posterior evolução dos caracteres florais sob seleção mediada por polinizador (Medel *et al.*, 2007). Por causa da ocorrência de espécies congênicas e simpátricas, da complexidade das interações plantas-polinizadores, entre outros fatores, as relações encontradas nas florestas úmidas oferecem uma oportunidade e um vasto campo para a pesquisa sobre problemas de interesses evolutivos e ecológicos (Bawa, 1990).

2.1 Aspectos reprodutivos

O termo fenologia se refere ao estudo do período de ocorrência de eventos biológicos repetitivos, a causa da sua periodicidade com respeito a forças bióticas e abióticas, tais como fotoperíodo, temperatura e pluviosidade, e a relação entre as fases de uma ou de diferentes espécies (Stearns e Lieth, 1974). Uma vez que as plantas com flores fornecem alimento a uma gama de animais, principalmente aos coletores de recursos florais, sua fenologia pode exercer influência no comportamento e ciclo de vida destes. Do ponto de vista evolutivo, a

fenologia poderia atuar como barreira reprodutiva pré-zigótica entre espécies congênicas e simpátricas, em casos onde não ocorre sobreposição no período de floração.

Um grande desafio aos biólogos evolucionistas tem sido a busca por entender a importância de fatores evolutivos que são responsáveis pelas características fenotípicas apresentadas pelas espécies nos dias atuais (Karrenberg *et al.*, 2007). Neste sentido, o estudo da biologia floral representa uma ferramenta fundamental a essa compreensão, pois tais características estão envolvidas diretamente com o sucesso reprodutivo das Angiospermas. O conceito de síndromes de polinização proposto nos trabalhos de Vogel (1954) e Faegri e van der Pijl (1979), prevendo a ocorrência de uma estreita relação entre a morfologia floral e do polinizador, foi considerado durante muito tempo como aplicável a todas as espécies de Angiospermas. Porém, na década de 1990, foram publicados artigos que questionam este conceito (Herrera, 1996; Waser *et al.*, 1996). Nos anos seguintes, outros trabalhos indicaram que a especialização do sistema de polinização é vantajosa para a planta quando acarreta em maior eficiência na polinização e promove fidelidade dos polinizadores (Johnson e Stenier, 2000; Barreto e Freitas, 2007).

Muitas espécies de plantas com flores apresentam características em sua biologia floral que podem interferir nos sistemas de polinização, como por exemplo, a apresentação secundária de pólen (ASP), caracterizada pela deposição do pólen para apresentação aos agentes vetores em outras partes da flor, que não sejam as anteras (Pacini e Hesse, 2004). Em muitos casos, possivelmente a ASP possui relevância na prevenção da autofecundação nas espécies homomórficas que apresentam autocompatibilidade (Yeo, 1993). O mecanismo de ASP está amplamente distribuído na ordem Gentianales, ocorrendo em Apocynaceae, Loganiaceae (*sensu* APG II, Souza e Lorenzi, 2008) e Rubiaceae. As espécies de *Retiniphyllum* possuem ASP (Lasprilla & Sazima, 2002). Howell *et al.* (1993), classificaram nove diferentes tipos de ASP encontrados em 16 famílias de Angiospermas, de acordo com o órgão usado para a apresentação do pólen, e Yeo (1993), descreve a ASP para 25 famílias de plantas. Robbrecht (1988) aponta a existência de ASP do tipo estilar, heterostilia e dioicia como estratégias reprodutivas encontradas na família Rubiaceae. A maioria das ocorrências de autoincompatibilidade nesta família foi registrada para espécies heterostílicas. Entre as homostílicas, em contraste, o predomínio é o de ocorrência de espécies autocompatíveis (Yeo, 1993).

A família Rubiaceae é considerada a com o maior número de espécies heterostílicas, A heterostilia é considerada um fator de importância na promoção da polinização cruzada. Porém, existem algumas espécies que não apresentam este tipo de polimorfismo. Tais táxons foram até o presente, menos estudados do que aqueles que possuem heterostilia. A perda da heterostilia, portanto, é frequentemente associada com um decréscimo da ocorrência de polinização cruzada (Sakai e Whright, 2008). Dentre os fatores apontados como causas desta perda, existem várias proposições na literatura, como colonização a longa distância, decréscimo na disponibilidade de polinizadores e decréscimo no tamanho das populações ou densidade das plantas (Ganders, 1975; Barret, 1985; Washitani, *et al.* 1994; Pauw, 2005; Sakai e Whright, 2008).

Cerca de um terço de todas as espécies conhecidas de plantas com flores são autopolinizadas (Allard, 1975; Allem, 2004). A soma de mais de um sistema reprodutivo (por exemplo, autopolinização e xenogamia) poderia ser considerada a “estratégia” de maior sucesso entre as espécies de plantas (Allem, 2004). A autogamia precisa ser necessariamente acompanhada da autocompatibilidade. Isto implica em inexistência de barreiras para o crescimento do tubo polínico e de barreiras pós-zigóticas. Nas últimas décadas vários estudos tem mostrado a ocorrência de um grande número de espécies autógamias (Brown, 1984; Yeo, 1993; Sagarin e Gaines, 2002; Busch, 2005; Judd, *et al.*, 2009), até mais do que era esperado para alguns ambientes. Além disso, a mudança de polinização cruzada para a reprodução uniparental, tanto por autofertilização (ou autogamia) ou por agamospermia tem sido relatada para algumas espécies (Baker *et al.*, 1983; Busch, 2005; Allem, 2004; Naumova, 2008; Judd *et al.*, 2009; Sharbel *et al.*, 2009). Esta forma de reprodução pode fixar genes específicos dentro de populações e implicar no surgimento de uma barreira reprodutiva isolando indivíduos que poderão sofrer diferenciação ao longo do tempo, por seleção de características específicas que impossibilitam trocas gênicas entre eles.

Quanto a apomixia, Carman (1997) apresentou dados de apomixia para 33 famílias e 126 gêneros de Angiospermas, excluindo-se aquelas que apresentam embrionia adventícia. Outros autores (*e.g.*, Baker *et al.*, 1983; Koltunow, 1993; Naumova, 1993; Allem, 2004; Naumova, 2008), por sua vez, consideram a embrionia adventícia dentro da apomixia. Assim, incluindo-se as famílias com embrionia adventícia, o número sobe para 86, ressaltando-se que até a publicação da revisão de Carman (1997), faltavam estudos para 112 famílias das 460 determinadas (Allem, 2004). Rieseberg *et al.*, (2006) afirmam, por sua vez, que casos de apomixia só foram registrados para 126 (<1%) de 13.000 gêneros estudados de plantas com

sementes. Deve-se destacar, porém, que em muitos estudos de biologia reprodutiva a apomixia deixa de ser testada por dificuldades metodológicas.

2.3 Isolamento reprodutivo e possibilidade de formação de híbridos

As espécies de Angiospermas estão isoladas reprodutivamente por dois mecanismos principais: (1) isolamento pré-zigótico, e (2) isolamento pós-zigótico (Rieseberg e Carney, 1998). Apesar destes mecanismos de isolamento, muitas espécies podem gerar híbridos de forma natural ou através de manipulação, através de troca de gene em cruzamentos interespecíficos (e.g., Levin, 1979; MacDade, 1990; Graham, *et al.* 1995; Ellstrand *et al.*, 1996; Arnold, 1997; Rieseberg, 1997; Rieseberg e Carney, 1998; Sang Zhong, 2000; Howarth e Baum, 2005; MacBreen e Lockhart, 2006; Rieseberg e Willis, 2007). A hibridação pode ser considerada um importante processo exercendo influência até mesmo na história da evolução cultural dos seres humanos, a partir do início da domesticação de plantas e animais no Neolítico (Rieseberg e Carney, 1998; Zirkle, 1935), mesmo que de forma aparentemente mais inadvertida do que racional (Rieseberg e Carney, 1998). Um fato interessante é o de que plantas que apresentam autocompatibilidade serem mais sujeitas a compatibilidade interespecífica do que as auto-incompatíveis (Rieseberg e Willis, 2007).

A hibridação pode levar ao surgimento rápido de características dentre de populações que as tornam mais sujeitas à especiação. Mas existem fatores que atuam no impedimento de sua ocorrência, mantendo o isolamento reprodutivo entre espécies correlacionadas, e eles podem ser de dois tipos: (a) ecológicos - síndrome de polinização, isolamento de habitats, vicariância, por exemplo; (b) ou mudanças genômicas - mutação, anaploidia ou poliploidia (Levin, 2000). O primeiro fator pode ser entendido como o resultado da seleção direcional na qual uma característica fenotípica é favorecida dentro de uma população, em um dado local, de acordo com as pressões ambientais impostas a esta espécie, ou ainda mudanças bruscas na área de ocorrência das espécies, como o surgimento de barreiras geográficas, ou ainda por alterações de origem antrópica. O segundo fator tem sido alvo de discussões quanto ao papel que exerce na evolução e especiação em muitos trabalhos de biologia evolutiva de plantas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Os estudos de biologia reprodutiva conduzidos com espécies congênicas e simpátricas podem ajudar a elucidar questões sobre as interações evolutivas existentes entre elas e auxiliar no entendimento sobre as pressões ecológicas que permitem a sua co-existência. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi identificar os mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos de três espécies simpátricas de *Retiniphyllum* Bonpl. (Rubiaceae) que ocorrem em campinaranas no município de Presidente Figueiredo, através da comparação da fenologia reprodutiva, biologia floral, polinização e sistema reprodutivo.

3.2 Específicos

1. Ocorre sobreposição no período de floração de *R. concolor*, *R. schomburgkii* e *R. speciosum*?
2. Como é a morfologia e biologia floral destas espécies?
3. As espécies compartilham visitantes florais e polinizadores?
4. Qual o tipo de sistema reprodutivo apresentado por elas?
5. Existe compatibilidade pré-emergente interespecífica?

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de estudo

Na Amazônia Central, campinas e campinaranas ocorrem espaçadamente ocupando pequenas áreas separadas por vastas extensões de floresta alta (Anderson, 1978), pois seguem a distribuição tipo mosaico dos solos arenosos onde ocorrem (Huber, 1995; Prance, 1996; Vicentini, 2004). Estes ambientes apresentam uma composição florística diferenciada da floresta de terra-firme dominante e heterogeneidade estrutural e florística relacionadas a fatores ambientais, além de um elevado nível de endemismo, fatores que contribuem para a alta diversidade regional (Vicentini, 2004).

Para este estudo, foram selecionadas duas áreas com populações compostas por 10 ou mais indivíduos de pelo menos duas das espécies, no município de Presidente Figueiredo, AM (S 02°03'03,7'' O 60°07'07,4''), onde ocorrem campinas e campinaranas sobre arenito e areia branca, que apresentam água superficial durante quase todo o ano. As áreas escolhidas são isoladas por floresta contínua, estando distantes umas das outras por pelo menos 10 km, e apresentam vegetação com sinais de alterações de origem antrópica. A primeira localidade escolhida está dentro do Parque Municipal das Orquídeas (S 02°03'18,11'' W 60°01'25,7''). A segunda, nas margens do rio Urubu, em uma propriedade particular situada, na altura da Cachoeira Princesinha do Urubu (S 02°03'03,7'' W 60°07'21,9''). Duas espécies ocorrem em ambas populações (*R. concolor* e *R. schomburgkii*) e uma (*R. speciosum*) está restrita a uma das áreas, nas margens do rio Urubu.

O clima da região é do tipo Amw, caracterizado por apresentar-se chuvoso, úmido e quente, com maior incidência de chuvas no período de dezembro a maio (Köppen, 1948). Ao nível regional, a temperatura é uniforme ao longo de todo o ano, variando entre a máxima de 38 °C e a mínima de 20 °C e a umidade relativa do ar apresenta-se alta e uniforme durante o ano, sendo de 97% o valor médio (Nava *et al.*, 1998). A quantidade de chuvas mensais para

2009 são mostradas na figura 1, com destaque para os meses de novembro em que a quantidade de chuvas foi muito baixa.

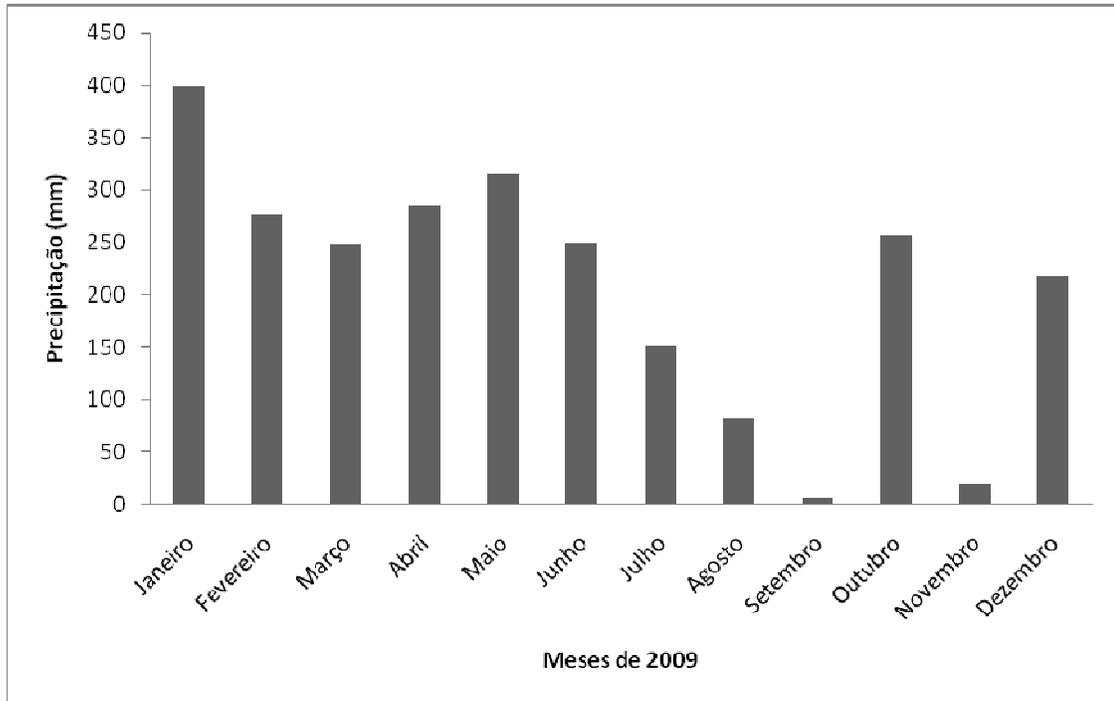


Figura 1. Pluviosidade mensal em 2009. FONTE: Programa LBA/INPA – torre de coleta K34, na Reserva Cuieiras, do INPA, localizada cerca de 60 km ao norte de Manaus, nas coordenadas geográficas S 2°36'32,67", W 60°12'33,48.

4.2 Espécies

Retiniphyllum concolor (Spruce ex Benth.) Müll. Arg. e *Retiniphyllum schomburgkii* (Benth.) Müll. Arg., são arbustos de médio a grande porte e *Retiniphyllum speciosum* (Spruce ex Benth.) Müll. Arg. é uma arvoreta. No município de Presidente Figueiredo, essas espécies estão presentes principalmente em áreas areno-rochosas próximas a cursos d'água. *Retiniphyllum concolor* e *R. speciosum* estão localizadas em vegetação de campinarana alta, e *R. schomburgkii* ocorre principalmente em áreas com vegetação mais aberta. Em alguns locais, ocorrem apenas duas destas espécies e em outros foram encontradas estas três e mais uma quarta espécie, *R. chloranthum* Ducke ocorrendo em simpatria. As três espécies

estudadas de *Retiniphyllum*, portanto, são simpátricas e compartilham o mesmo hábitat de campinarana, apesar de pequena diferenciação de micro-hábitat de *R. schomburgkii*, que tende a ocorrer em áreas mais abertas.

4.3 Fenologia reprodutiva

As observações sobre a fenologia reprodutiva das três espécies foram realizadas mensalmente de janeiro a dezembro de 2009. O número de flores abertas por indivíduo/dia foi obtido através de observações diretas no campo em 10 indivíduos de cada uma das espécies. Duas populações de *R. concolor* e *R. schomburgkii* foram estudadas e uma população de *R. speciosum* (rio Urubu).

Para quantificação da intensidade da floração, foi adotada a metodologia proposta por Fournier (1974), utilizando escala de zero a quatro: 0 = ausência da fenofase; 1 = presença da fenofase com magnitude entre 1% e 25%; 2 = presença da fenofase entre 26% e 50%; 3 = presença da fenofase entre 51% e 75% e 4 = presença da fenofase entre 76% e 100%.

4.4 Morfologia floral e inflorescências

As características morfológicas descritas são as seguintes: quantidade de flores por inflorescência, número de inflorescências por indivíduo, número e disposição das peças florais, cor, tamanho e simetria. Para a determinação das cores das flores e frutos utilizou-se um guia de cores (Küppers, 1999).

4.5 Biologia floral

As informações sobre a biologia floral obtidas em campo foram: horário, sequência e duração da antese, duração da flor, emissão de odor e disponibilidade de néctar e pólen, padrão de produção de néctar e porcentagem de açúcar neste. A receptividade do estigma foi determinada a partir da separação dos lobos estigmáticos, uma indicação usualmente utilizada para tal verificação em espécies representantes da Ordem Gentianales (Coelho e Barbosa, 2004), e confirmada com H₂O₂ (peróxido de hidrogênio). Estigmas de flores frescas foram examinados sob microscópio estereoscópico e óptico, para análise da área estigmática (Heslop-Harrison e Shivanna, 1977; Correia, *et al.*, 2005). Para a verificação da emissão de odor, utilizou-se o reagente vermelho neutro, que cora os locais de liberação nas flores. Para tanto, utilizaram-se flores coletadas e submersas por dez minutos na solução do reagente, totalizando 20 flores de cada uma das espécies (Dafni, 1992).

O horário de disponibilidade de pólen e o volume de néctar secretado foram obtidos de flores em pré-antese de dez indivíduos, duas flores cada (N=20). As observações, a partir da abertura floral, foram feitas em intervalos de seis em seis horas, até a senescência da flor. Durante o período noturno, as observações se restringiram à observação do processo de abertura. Para a espécie *R. schomburgkii*, a quantidade de flores em processo de abertura foi mensurada por contagem em intervalos de hora a partir das 4:00 da manhã até as 19 horas, pela detecção da existência de picos de ocorrência deste evento ao longo do dia. O registro do padrão de produção de néctar foi obtido de flores ensacadas em pré-antese, para evitar o contato com os visitantes florais. Para coleta e mensuração do néctar para determinação da porcentagem de açúcar obtidos a partir de 20 flores de diferentes indivíduos, para cada uma das espécies, fez-se uso de microsseringa. A porcentagem de açúcares foi mensurada em campo com o auxílio de refratômetro portátil.

4.6 Visitantes florais

Os visitantes florais das três espécies foram observados em diferentes horários ao longo do dia. Durante as sessões de visita, o comportamento de cada um dos visitantes foi

registrado, anotando-se as informações sobre período, duração das visitas, número de flores visitadas e número de indivíduos/inflorescência visitadas. As observações começaram na madrugada por volta das 4h e se estenderam até que o último visitante floral fosse visto no final da tarde e início da noite. Para a busca de possíveis variações temporais nas espécies visitantes, as observações foram feitas durante todos os meses, sendo de no mínimo 2 horas por espécie/mês até 15 horas/mês. O período total de observação, para cada uma das espécies, excedeu às 50 horas. Para *R. concolor*, foram feitas observações noturnas em dois dias, totalizando 12 horas e 50 minutos de observações realizadas no mês de maio de 2009. Para *R. schomburgkii*, foram feitas observações no início da noite em dois dias, totalizando 4 horas, no mês de outubro de 2009. Para *R. schomburgkii* e *R. speciosum*, que receberam visitas de beija-flores, foram feitas observações em tendas camufladas montadas em há alguns metros das plantas, e eventualmente utilizou-se binóculo nas observações. Foram feitas filmagens para melhor observação e análise do comportamento dos visitantes. A distinção entre polinizadores e pilhadores se baseou no comportamento de forrageio apresentado durante a coleta do recurso floral.

Com relação à frequência, os visitantes foram classificados em quatro categorias:

F – frequentes = Mais de uma visita a cada turno de observações;

PF – pouco frequentes = Uma visita a cada turno;

R – raros = Uma a cinco visitas durante todos os períodos de observações;

O – ocasionais = Visitas frequentes ou pouco frequentes em determinados meses do ano.

Para *R. concolor*, a diferenciação entre visitantes e pilhadores foi feita através da marcação de dez flores por grupo de visitantes. Assim, após cinco visitas por cada agente possível vetor de pólen as flores foram ensacadas e acompanhadas até a formação de frutos e sementes, para confirmação da efetividade da polinização.

Quando possível, os insetos foram coletados para verificação do local de deposição de pólen, e encaminhados a especialistas para a identificação. Para aves, foram feitos registros fotográficos e/ou filmes para identificação por especialista.

4.7 Sistema reprodutivo

Para obtenção da razão pólen/óvulo proposta por Cruden (1977), que é um indicativo indireto do sistema reprodutivo das espécies, estimou-se o número de grãos de pólen seguindo o método descrito por Kearns e Inouye (1993), retirando-se pólen de uma antera de dez flores em pré-antese, de cinco diferentes plantas (N=10 anteras), para cada uma das espécies. A contagem do número de grãos de pólen por flor foi realizada sob microscópio óptico com aumento de 100 X. O número de óvulos foi determinado através de corte realizado no ovário de dez flores de cinco indivíduos, igualmente para cada uma das três espécies.

Para o teste direto dos sistemas reprodutivos das três espécies, realizaram-se cinco tratamentos: (a) apomixia (botões emasculadas), (b) autogamia (autopolinização espontânea), (c) geitonogamia (polinização com pólen próprio do indivíduo), (d) xenogamia (polinização cruzada), e (e) condições naturais, da seguinte forma:

- (a) Apomixia: botões emasculadas ensacadas até a verificação da formação de frutos.
- (b) Autogamia (autopolinização espontânea): flores ensacadas em pré-antese, observadas até a formação de frutos, sem manipulação das flores.
- (c) Geitonogamia: flores emasculadas e polinizadas com pólen próprio do indivíduo e acompanhadas até a formação de frutos.
- (d) Xenogamia: flores emasculadas e polinizadas com pólen proveniente de outros indivíduos, para verificação da taxa de formação de frutos a partir de polinização cruzada.
- (e) Condições naturais: neste tratamento, foi feito apenas a contagem dos botões florais em ramos identificados, para obter-se a taxa de formação de frutos em condições naturais, não havendo qualquer tipo de manipulação.

Para a realização dos testes de polinização, cerca de 150 botões por espécie/tratamento foram ensacados com tecido *voile*, exceto para o tratamento a polinização natural, em que as flores não foram ensacadas e as flores foram acompanhadas até a formação de frutos. Foram utilizados cinco indivíduos por tratamento/espécie. A emasculação foi feita abrindo-se o botão floral e retirando-se as anteras anteriormente a liberação de pólen. Os

indivíduos utilizados nos experimentos distanciam-se por no mínimo 10 m uns dos outros, para evitar que indivíduos clonais, irmãos ou provenientes de reprodução vegetativa fossem selecionados. O número de frutos e sementes produzidos por tratamento foi registrado, para avaliação da eficiência da polinização para cada um dos tratamentos.

Para verificação do impacto da emasculação na produção de frutos, realizou-se dois experimentos pilotos de polinização cruzada, um em que as flores foram emasculadas e outro em que esse procedimento não foi realizado. Para tanto, foram selecionados cinco indivíduos de cada uma das espécies e um total de 30 flores por tratamento.

4.8 Isolamento reprodutivo

Para constatação do isolamento reprodutivo entre as espécies foram montados seis experimentos de polinizações interespecíficas: (1) *R. concolor* X *R. schomburgkii*; (2) *R. concolor* X *R. speciosum*; (3) *R. schomburgkii* X *R. concolor*; (4) *R. schomburgkii* X *R. speciosum*; (5) *R. speciosum* X *R. concolor*; e (6) *R. speciosum* X *R. schomburgkii*). Assim, cada espécie atuou como receptora e doadora de pólen, totalizando no mínimo cinco indivíduos de cada espécie como receptores, distanciados por pelo menos 10 m de distância. O total de flores ultrapassou 100 flores por tratamento. Para evitar interferências, flores foram diretamente utilizadas para as polinizações, evitando-se assim o contato e contaminação do pólen. Destaca-se ainda, que as flores polinizadas haviam sido emasculadas em fase de botão.

4.9 Testes de germinação

Foram montados dois experimentos para realização de testes de germinação utilizando sementes obtidas de frutos formados nas polinizações controladas: (1) sementes provenientes do teste do sistema reprodutivo de cada uma das espécies e (2) sementes provenientes de

polinizações interespecíficas. Para cada um dos experimentos utilizou-se 10 sementes, totalizando 190 sementes. O substrato no qual as sementes foram depositadas para a germinação consistiu em areia branca, solo coletado no local de estudo e adubo orgânico, simulando as condições naturais dos ambientes onde crescem as três espécies. Para algumas sementes, testou-se a quebra de dormência com água fria e água quente (Perez, 2004).

4.10 Material Botânico

A identificação das espécies foi feita por comparação com material herborizado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Fotos do material coletado também foram enviadas a especialista, para confirmação da identidade específica do material. O material botânico (número do coletor = SCHWADE, M. R. M. 045, 046 e 047) foi depositado no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), e duplicatas foram encaminhadas à especialista do gênero (Unellez/Herbario Universitário – Colômbia).

4.11 Análise dos dados

Para análise dos dados de fenologia utilizou-se o método de intensidade de Fournier (1974) e o índice de atividade de presença e ausência (Bencke e Morellato, 2002). Diferenças entre as espécies em relação ao valor de atividade dos indivíduos em fenofases reprodutivas foram verificadas pelo teste do Chi^2 .

5. RESULTADOS

5.1 Fenologia

A floração de *R. concolor*, *R. schomburgkii* e *R. speciosum* apresenta um único ciclo que se estende por vários meses (Figura 2). Os indivíduos (de cada espécie) não foram assincrônicos apresentaram sincronia na floração durante todo o período, ocorrendo momentos em que poucos indivíduos apresentavam flores (Figura 2). O período de maior emissão de flores em *R. concolor* e *R. speciosum* foi de junho a outubro e, em *R. schomburgkii*, de junho a dezembro. O índice de atividade das espécies não diferiu significativamente (Kruskal-Wallis, $p = 0,443$). Como o padrão de fenológico das espécies não apresentou divergência nos dois locais de estudo, com coincidência de período de floração e proximidade na média de produção de flores, os dados são mostrados em um único gráfico, tendo sido excluída a área do Parque das Orquídeas.

Retiniphyllum concolor apresentou flores de janeiro a novembro e, de forma isolada, picos individuais de floração/frutificação ocorreram em vários momentos durante o período de estudo. Em relação à população, ocorreram dois picos principais, um no mês de julho, com 37,5% dos indivíduos com flores e 60% de intensidade, e outro em outubro, com 25% de indivíduos com flores e 40% de intensidade.

No município de Presidente Figueiredo, *R. schomburgkii* apresenta-se distribuído em grandes populações com altura variando de 0,5 m a 1,5 m em áreas de campinarana que sofreram alterações de origem antrópica, ou ainda por perturbações de origem natural como no caso de incêndios de origem não antrópica (ocorrência não avaliada em campo). Nesta situação, a floração se estendeu de abril a fevereiro, com maior produção de flores entre julho e dezembro. Na campinarana de baixa a média abertura, *R. schomburgkii* ocorre de forma

isolada e com porte maior, atingindo até cerca de 3 m de altura. A floração dos indivíduos nesta segunda situação é quase imperceptível durante todo o ano. Entre os indivíduos acompanhados para a fenologia reprodutiva, ocorreu grande variação no número de flores: enquanto alguns indivíduos não apresentavam flores, outros atingiam números maiores do que 100 flores. Apesar deste fator, *R. schomburgkii* apresentou maior sincronia de indivíduos em floração se comparado as duas outras espécies.

Por sua vez, *R. speciosum* também apresentou flores praticamente o ano todo, com uma pausa para a maioria dos indivíduos nos meses de janeiro, fevereiro e dezembro. Assim como as outras duas espécies, a emissão de flores é praticamente constante, e picos individuais de floração ocorreram em vários meses durante o ano de 2009. Desta forma, em geral, a média da população é baixa, mas individualmente, picos de emissão de flores ocorrem de forma diferenciada e em vários momentos durante o ano. Indivíduos localizados em borda e clareiras produziram mais flores do que indivíduos que ocupam o sub-bosque.

Indivíduos de *R. concolor* e *R. schomburgkii* possuem frutos (imaturos e/ou maduros) quase o ano inteiro. Porém, a produção de frutos de *R. schomburgkii*, foi menor durante os meses de setembro a novembro, possivelmente pela queda no número de visitantes florais observada também para estes meses. Deve-se destacar, porém, que o ano de 2009 foi atípico: ocorreram dois meses de pouca incidência de chuvas, setembro e novembro (Figura 1). Nesses meses houve também redução no número de visitantes e a produção de frutos foi afetada. Com relação a *R. speciosum*, no mês de fevereiro, foram encontrados poucos frutos na população deste estudo, provavelmente pela ocorrência de chuvas neste período.

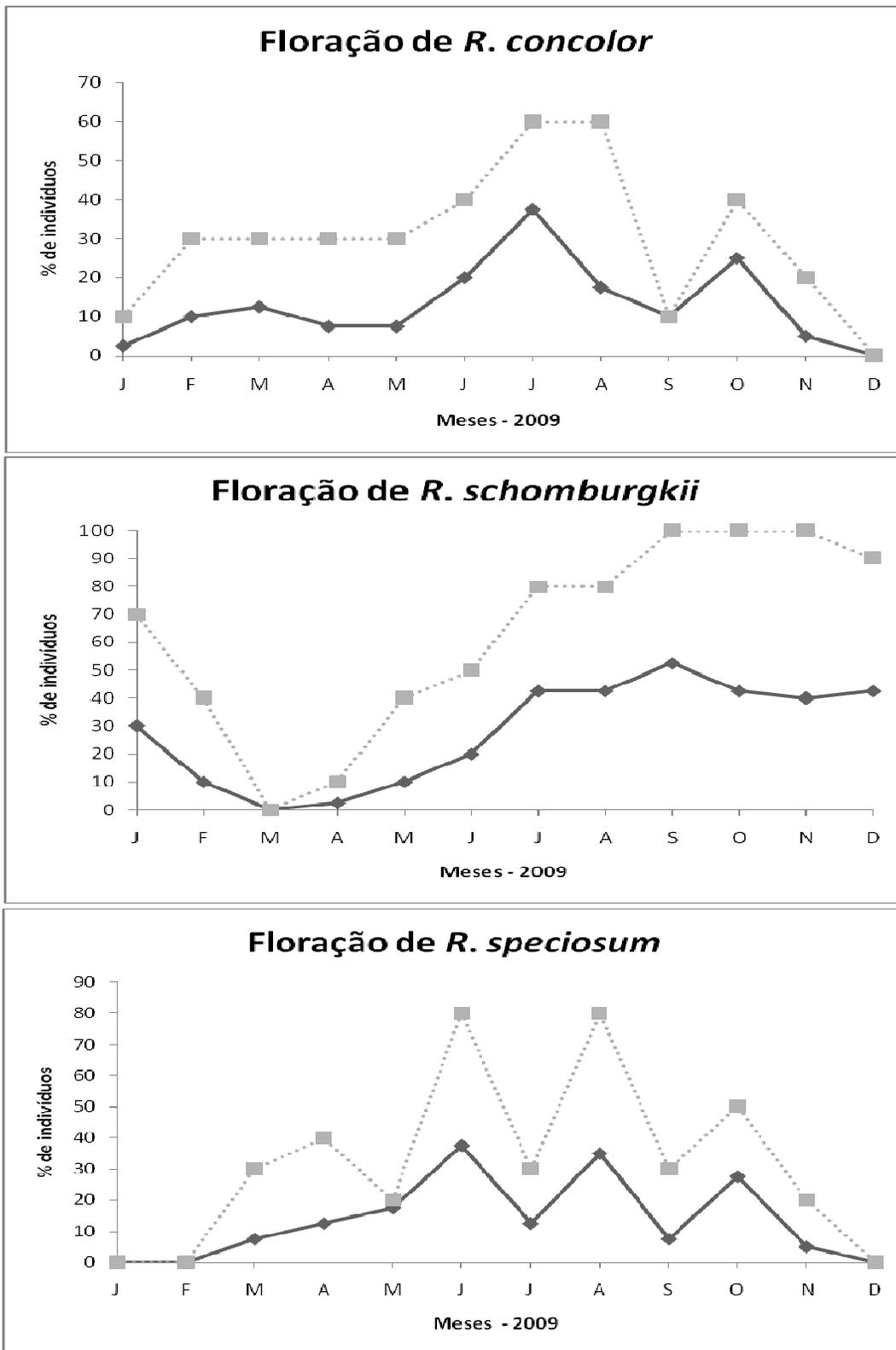


Figura 2. Fenologia reprodutiva de 10 indivíduos de *Retiniphyllum concolor*, *R. schomburgkii* e *R. speciosum*, onde (—) é percentual de intensidade de Fournier e (•••) índice de atividade.

5.2 Morfologia das inflorescências e flores e biologia floral

Retiniphyllum concolor apresenta inflorescência do tipo racemo e *R. schomburgkii* e *R. speciosum* possuem inflorescência em espiga (Schumann, 1889; Steyermark, 1974). As flores das três espécies são tubulares, com lacínios livres e prefloração contorta. A coloração é creme-esverdeada, em *R. concolor*; branca, em *R. schomburgkii*; e rosa intenso em *R. speciosum* (Figura 3). No centro da corola, onde há a separação dos lacínios, *R. concolor* e *R. schomburgkii* apresentam linhas de cor rosa, que aparentam ser guias de néctar (Figura 4, A e B, indicado com seta preta). O androceu é composto por cinco estames e cinco anteras que aparentemente se abrem no botão em pré-antese. O pistilo é composto por um estigma pentalobulado, ovário pentalocular, com cinco rudimentos seminiais, que quando fecundados, dão origem a cinco sementes viáveis. As características morfológicas específicas são mostradas comparativamente na tabela 1.

A sequência de abertura das flores nas inflorescências de *R. concolor* e *R. schomburgkii* segue um padrão em que as flores amadurecem primeiramente no meio da inflorescência e posteriormente nas duas extremidades, ápice e base, simultaneamente, (Figura 1, A e B). Esse padrão é mais destacado na primeira espécie. Desta forma, quando existem frutos maduros no centro da inflorescência eles ainda estão em estádios iniciais nas extremidades. Possivelmente, este processo teria alguma implicação na polinização ou dispersão dos frutos. Em *R. speciosum* esse padrão aparentemente não ocorre ou é menos destacado.

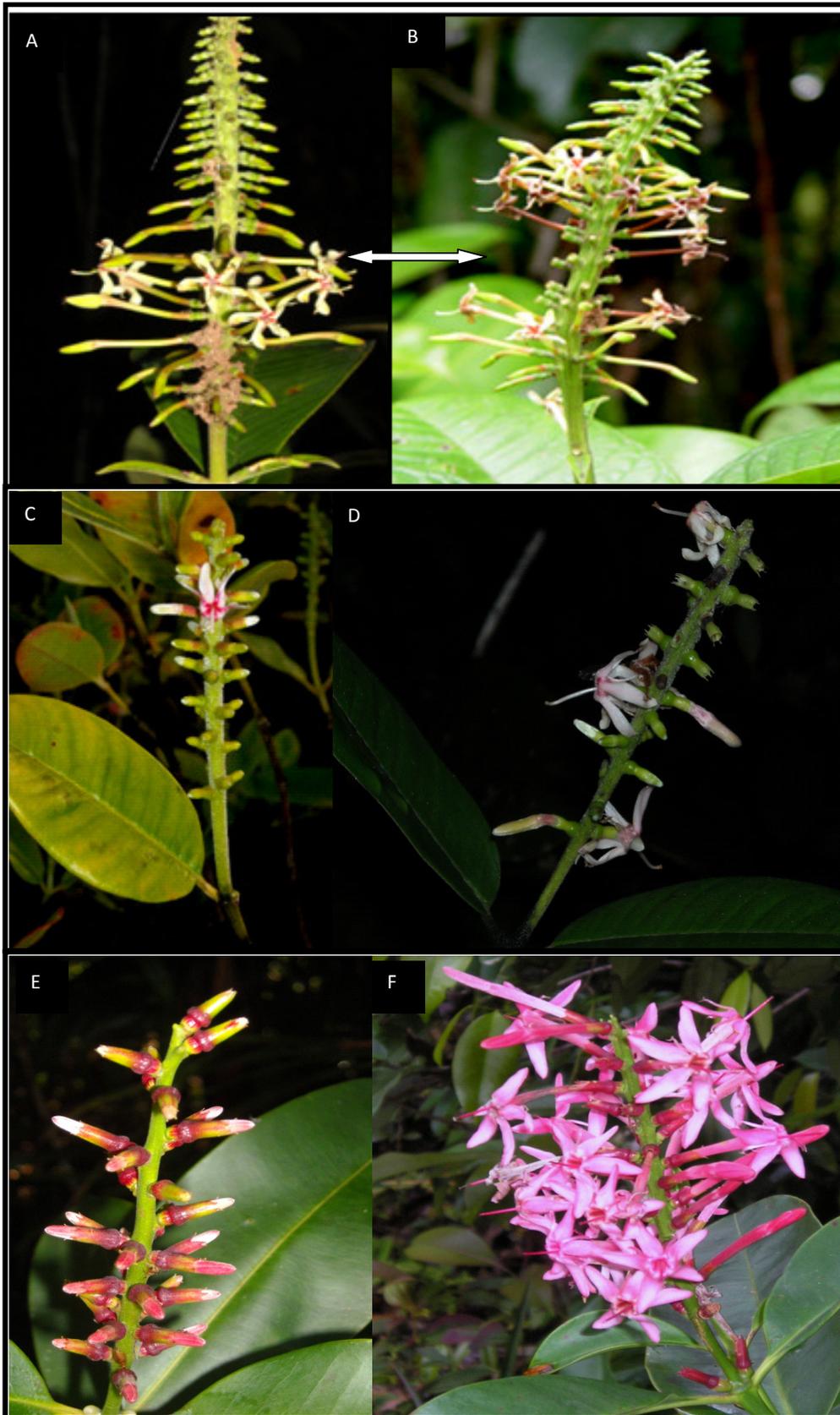


Figura 3. Inflorescências das espécies estudadas. A e B: *Retiniphyllum concolor*; C e D: *R. schomburgkii*; E e F: *R. speciosum*. Detalhe das figuras A e B indicam a evolução da abertura das flores nas inflorescências.

Tabela 1. Características florais de *Retiniphyllum concolor*, *R. schomburgkii* e *R. speciosum*.

Caracter	<i>R. concolor</i>	<i>R. schomburgkii</i>	<i>R. speciosum</i>
Número de flores por inflorescência	77.5±27.26	27.47±6.3	22.15±2.66
Cor da flor	palha e magenta	branca e rosa	rosa intenso
Tubo da corola (mm)	24.34±1.21	8.78±1.58	31.62±1.51
Emissão de odor	sim (doce)	sim (doce)	-
Liberação nectar	sim	sim	sim
Estames/anteras	5	5-6	5
Estigma fora do tubo da corola (mm)	7.28±1.08	9.84±0.9	11.89±0.73
Rudimentos seminiais	5	5	5

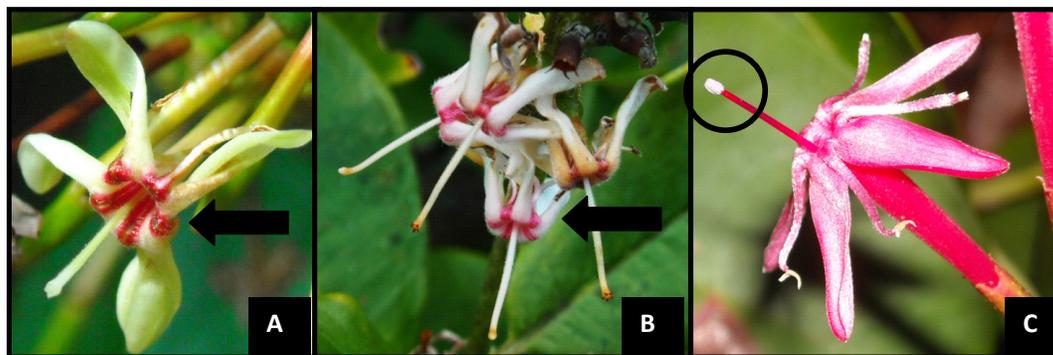


Figura 4. Padrão de coloração. A: *Retiniphyllum concolor*; B: *R. schomburgkii*; C: *R. speciosum*. Setas (em A e B) indicam as regiões com aparência de guias de néctar e círculo indica depósito de pólen no estigma, no momento da abertura floral (apresentação secundária de pólen estilar). .

A flor de *R. schomburgkii* apresenta um posicionamento voltado para baixo na inflorescência (Figura 5). Os estiletos de *R. concolor* e *R. schomburgkii* possuem uma curvatura, provavelmente para que este sirvam de local de pouso para os potenciais polinizadores, como observado em campo. Por sua vez, *R. speciosum* possui o estilete reto e

as flores normalmente direcionadas para cima (Figura 5). Igualmente, poderia sustentar o pouso de pequenos insetos, mas neste caso não parece adaptado para este fim.



Figura 5. A: flor de *Retiniphyllum schomburgkii*; B: flor de *R. concolor*; C: flor de *R. speciosum*.

Durante os meses de setembro e outubro de 2009, as flores de alguns indivíduos de *R. schomburgkii* apresentaram menor tamanho total: flores que apresentavam comprimento total de até 20 mm, com média em torno de 18 mm, nesta época apresentaram no máximo 15 mm. Além disso, em alguns casos a duração da antese também foi reduzida e muitas flores abriam-se já com os lobos estigmáticos separados, e as anteras aparentemente não produziam pólen. Esta redução e a mudança na biologia floral poderiam ser causadas pela falta de água no ambiente, uma vez que nestes dois meses choveu pouco no local de estudo, e os indivíduos que apresentaram estas características provavelmente estavam em locais onde não há lençol freático superficial e o escoamento da água ocorre de forma rápida.

As espécies são dicógamas protândricas. A exposição do pólen a visitação ocorre no momento da abertura floral. As flores possuem apresentação secundária de pólen, e este fica depositado no estilete, enquadrando-se portanto no padrão estilar. A partir do segundo dia os lobos estigmáticos começam a se separar em *R. concolor* e *R. speciosum*, e no terceiro dia em *R. schomburgkii*, caracterizando o início da receptividade. A abertura floral ocorre ao longo de todo o dia para as três espécies. Foram vistas flores de *R. concolor* e *R. speciosum* se abrindo até no período noturno, não tendo sido detectado um padrão de abertura. As flores de *R. schomburgkii*, por sua vez, aparentemente apresentam picos diurnos de abertura entre: 4:30 e 5:30, 7:30 e 8:30, 10:30 e 11:30, 13:30 e 14:30 e, por fim, entre 14:30 e 17:30. Em indivíduos no auge da floração, em tais momentos, a abertura de flores em cada um destes períodos podia chegar a seis flores, totalizando em dias ensolarados, no final do dia, até um máximo registrado de 26 flores. Durante a noite, para esta espécie, não foram observadas flores em processo de abertura.

Para as três espécies, o processo de abertura é mais ou menos coincidente: no primeiro momento, é perceptível um leve inchaço na parte da corola em que as pétalas são recortadas,

situação que perdura por várias horas. Após esse período, ocorre a abertura da flor de forma rápida: a partir do início da separação dos lacínios à completa separação dos mesmos e posicionamento em sentido oposto ao do ápice, decorrem apenas cerca de 40 segundos a 2 minutos. O filete com o resto das anteras e tecas se movimentam juntamente com as pétalas, pois encontra-se unido à inserção dos lacínios. Quando esse processo termina, a flor apresenta uma carga polínica no estigma, cujos lóbulos encontram-se ainda fechados.

Para *R. concolor*, geralmente há o predomínio de uma fase (liberação de pólen ou receptividade do estigma) nas inflorescências, porém um mesmo indivíduo pode apresentar várias flores expondo o pólen ou com o estigma receptivo simultaneamente em uma ou mais inflorescências.

As flores de *R. concolor* e *R. schomburgkii* (Figura 6) duram em média quatro dias e após este período a corola murcha e escurece. Porém, quando os estigmas não foram polinizados, a flor pode permanecer viável por mais tempo. Na época seca, flores de indivíduos de *R. schomburgkii* que ocorrem principalmente em locais em que aparentemente o lençol freático é mais profundo, apresentaram redução no tamanho, na quantidade de pólen exposto e na duração da antese. Em *R. concolor* e *R. schomburgkii*, aparentemente a flor murcha pouco tempo depois de ser polinizada. Em *R. speciosum*, as flores estão viáveis por até cinco dias, e somente após estes dias a flor senesce. No primeiro dia, ocorre a liberação do pólen no estigma, que apresenta os lóbulos fechados e não receptivos. A partir do segundo dia, ocorre a lenta separação dos lobos. Esse processo demora várias horas, até um tempo máximo de 24 horas, e as flores geralmente só estarão receptivas na manhã do terceiro dia. Para algumas flores, aparentemente a distensão se inicia no primeiro dia de antese, algumas horas após a abertura floral. Quando a flor não é polinizada, sua duração pode se estender por até mais um dia, e o estigma permanece viável por até sete dias.

Discos nectaríferos são encontrados acima do ovário, circulando a base do estilete, característica esta que é aparentemente comum às espécies de Rubiaceae (Nicolson *et al.*, 2007). A secreção de néctar começa antes da abertura das flores. Espécies de *Euglossa* spp. e *Phaethornis ruber* Linnaeus, 1958, potenciais polinizadores respectivamente de *R. schomburgkii* e *R. speciosum*, foram vistos visitando botões, o que acelera o processo de abertura destas flores. As características individuais para cada espécie são mostradas na Figura 6 (gráficos de produção de néctar e concentração de açúcares totais).

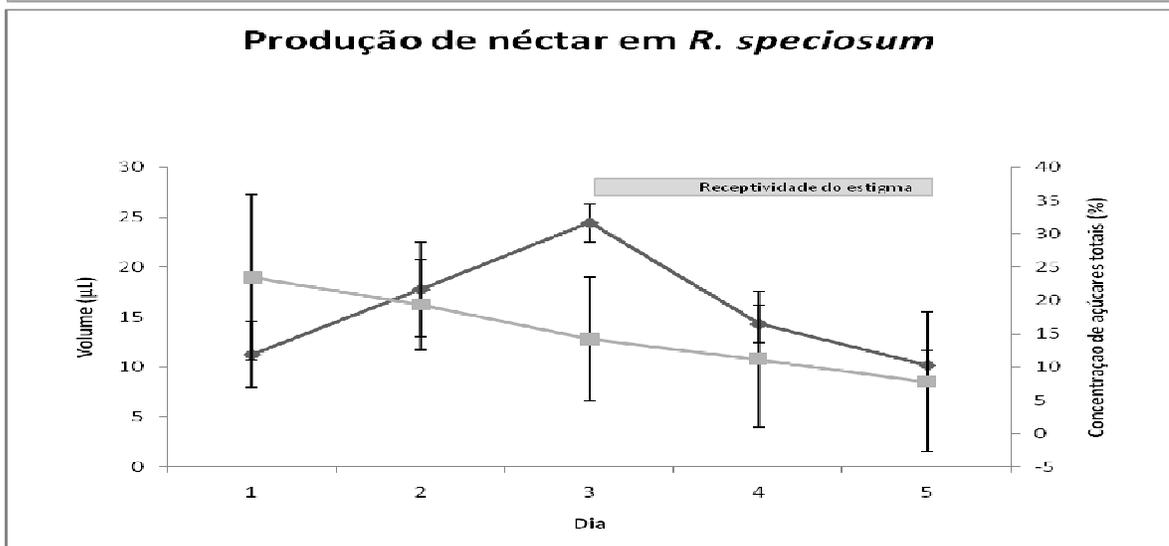
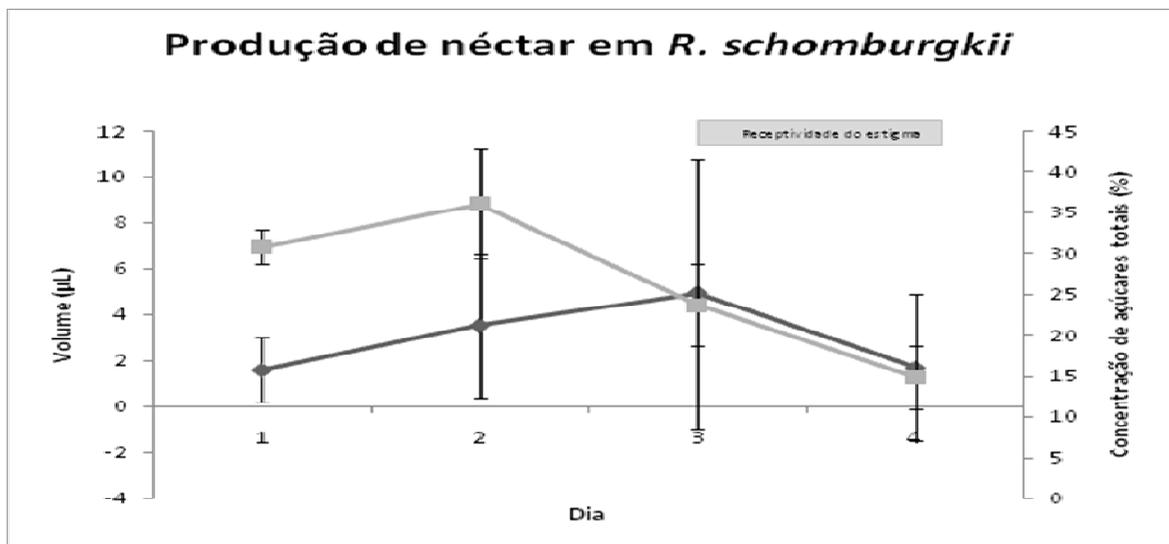
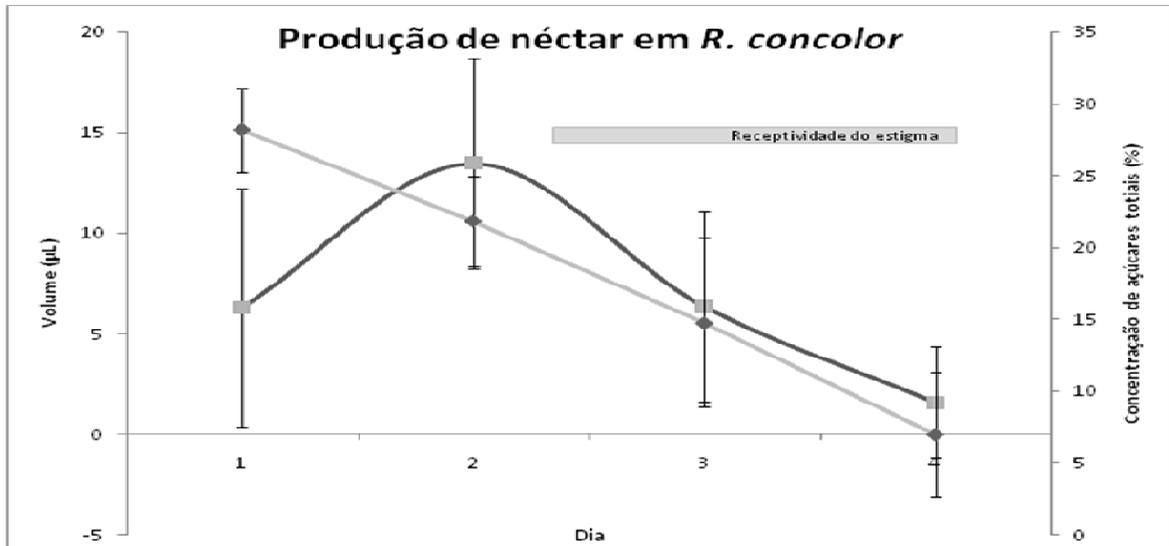


Figura 6. Gráficos mostrando a produção de néctar. A linha escura representa o volume (eixo da esquerda) e a clara, a % de açúcares totais presentes no néctar (eixo da direita).

A emissão de odor ocorre apenas em *R. concolor* e *R. schomburgkii*. Em ambas o odor é agradável e adocicado. Em *R. concolor*, a emissão de odor é mais forte durante o início da antese, se tornando gradativamente menos intenso. Em *R. schomburgkii*, a liberação de odor também segue este padrão, mas flores ainda em antese de dias anteriores também emitem mais odor quando ocorrem os picos de abertura floral. Desta forma, a percepção de odor é mais intensa em alguns momentos do dia.

O fruto das três espécies é do tipo drupa (Figura 7). Em *R. concolor*, seguindo a sequência de abertura floral, o amadurecimento dos frutos ocorre do centro para as extremidades (Figura 7 A). Durante o período de observações, apenas uma vez foi visto uma espécie de ave, (bico-de-porcelana ou pipira-vermelha, *Ramphocelus carbo* Pallas, 1764), se alimentando de fruto de *R. speciosum* e, possivelmente, atuando como dispersor.

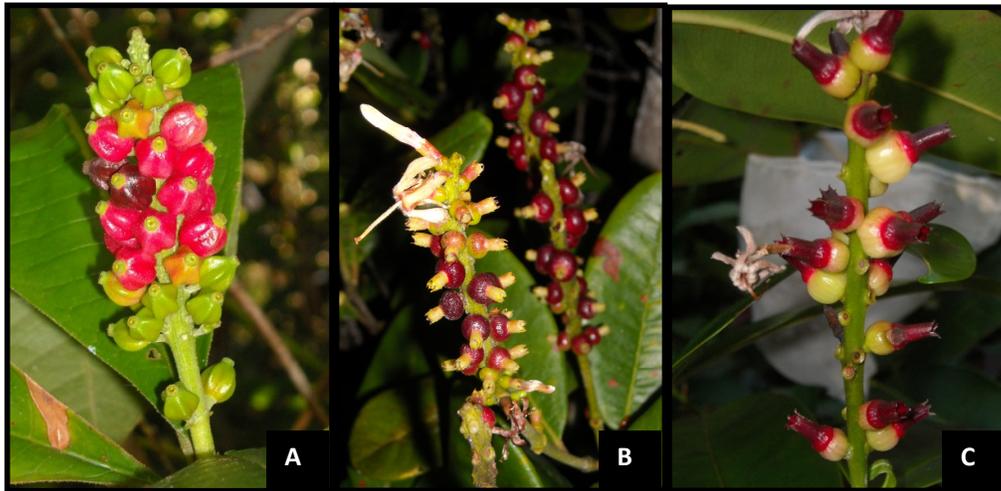


Figura 7. Frutos. A: *Retiniphyllum concolor*; B: *R. schomburgkii*; C: *R. speciosum*.

5.3 Visitantes florais

As flores são visitadas por abelhas, beija-flores, borboletas e mariposas (Figura 8). Houve sobreposição de visitantes, mas a efetividade das visitas ocorre preferencialmente por diferentes grupos para cada uma das espécies (Tabela 2). *R. concolor* foi visitada apenas por abelhas Trigonini, Meliponini e Euglossini, enquanto que *R. speciosum* recebeu visitas de

abelhas e beija-flores Phaetornithinae. *R. schomburgkii* recebeu o maior número de visitas e tipos de visitantes, tendo sido avistados abelhas de pequeno a grande porte, borboletas, mariposas e beija-flores. Fêmeas de *Euglossa* sp.2, visitaram flores das três espécies, e esta foi considerada uma potencial polinizadora de *R. concolor* e *R. schomburgkii*. Porém, para as flores de *R. speciosum*, o comportamento nas visitas consistia em pousos na corola e no estigma e introdução da glossa dentro do tubo da corola para pilhagem de néctar, não fazendo contato com o estigma indicando que não ocorre efetividade na polinização. Além disso, houve sobreposição de visitas de uma espécie de beija-flor entre *R. schomburgkii* e *R. speciosum* (*Phaethornis ruber*, Linnaeus, 1758).

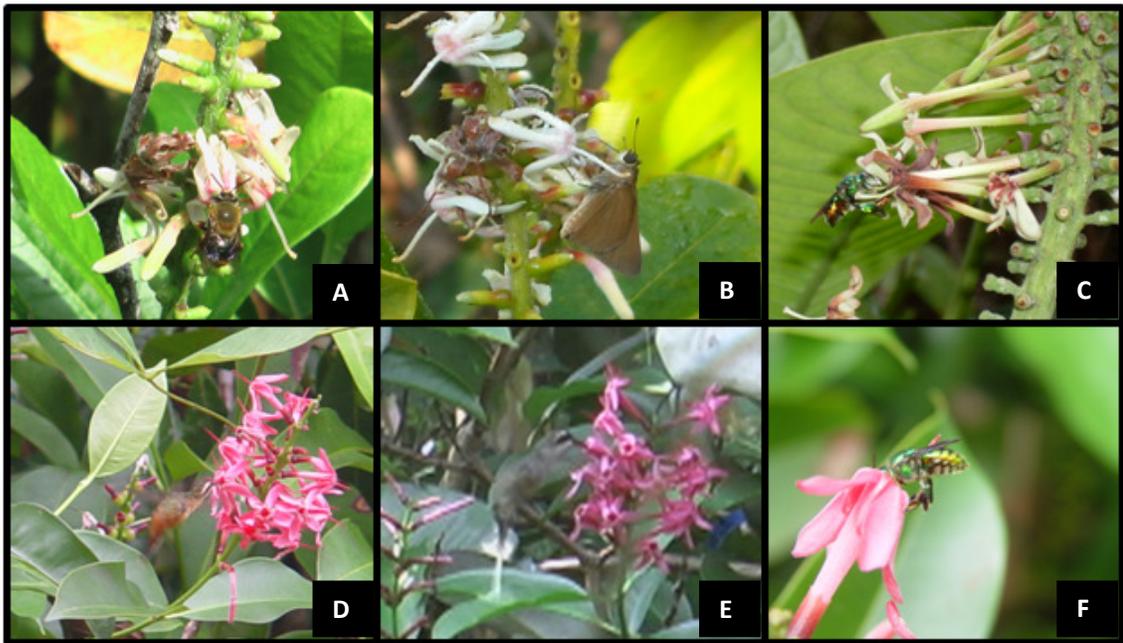


Figura 8. Visitantes florais. A: *Centris* sp., potencial polinizador de *Retiniphyllum schomburgkii*; B: Borboleta não identificada sp.1 – polinizador eventual de *R. schomburgkii*, notar que frequentemente o estigma não é tocado; C: Visita de *Euglossa* sp.2, principal polinizador de *R. concolor*; D: *Phaethornis ruber*, polinizador efetivo de *R. speciosum*; E: *P. superciliosus*, polinizador efetivo de *R. speciosum*; F: *Euglossa* sp.2, coletando néctar em *R. speciosum* – a espécie é visitante frequente das três espécies estudadas.

Abelhas *Euglossa* sp.1, principais visitantes desta espécie, foram responsáveis por mais de 80% das visitas. Além disso, atuaram como aceleradoras do processo de abertura floral, principalmente no final da manhã e da tarde, quando o grande número de visitas já havia esgotado as principais fontes de néctar. É comum se avistar visitantes pousando em flores em processo de abertura várias vezes, e com isso, muitas flores acabam se abrindo durante estes pousos. Os experimentos de visitação controlada (N= 10 flores) confirmaram que *Euglossa* sp.1   polinizadora efetiva de *R. concolor*. Além disso, outra espécie de abelha visitante (*Trigona* sp.2) somente eventualmente realizava a poliniza o.

Apesar de a espécie apresentar antese noturna, durante todo o período de observa es   noite, realizadas em dois dias com diferenças na luminosidade proveniente da lua, nenhum visitante noturno foi avistado. Porém, possivelmente, pelas características apresentadas pela flor (antese noturna, colora o discreta e libera o de odor noturno) acredita-se que possam existir visitantes noturnos.

Retiniphyllum schomburgkii

Retiniphyllum schomburgkii recebeu visitas de 21 espécies: 14 de abelhas, cinco de Lepidopteros e tr s de aves (Tabela 3). Durante o período de maior número de flores, o principal visitante de *R. schomburgkii*   abelha, *Centris* sp., sendo que apenas machos foram coletados. Suas visitas corresponderam a mais de 50% das visitas nos meses de julho e agosto quando a produ o de flores foi maior.

Tabela 2. Visitantes florais de *Retiniphyllum concolor*, *R. schomburgkii* e *R. speciosum*. Papel na polinização: PP = polinizador potencial; PE = polinizador eventual; CP = coletor de pólen; CN = coletor de néctar; (-) visitante floral não observado.

Espécies	<i>Retiniphyllum concolor</i>	<i>Retiniphyllum schomburgkii</i>	<i>Retiniphyllum speciosum</i>
APOIDEA			
Anthophoridae			
Centridini			
<i>Centris</i> sp.	-	PP	-
Exomalopsini			
<i>Paratetrapedia flavipennis</i> (Smith, 1989) - macho	-	CN	-
Xylocopini			
<i>Xylocopa</i> sp.	-	CN/PE	-
<i>Xylocopa similis</i> (Smith, 1874)	-	PE	CN/PE
Apidae			
<i>Bombus</i> sp.	-	PE	-
<i>Trigona</i> sp.1	CP	CP	CP
<i>Plebeia</i> sp.	CP/PE	CP/PE	CP/PE
<i>Melipona</i> sp.	-	PP	-
<i>Trigona</i> sp. 2	-	CN/CP	-
Euglossini			
<i>Euglossa</i> sp.1 – fêmea	CN	CN	-
<i>Euglossa</i> sp.2 – fêmea	PP	PP	CN
<i>Euglossa viridis</i> (Perty, 1833)	CN	CN	-
<i>Euglossa</i> sp.3			
Halictidae			
<i>Augochloropsis</i> sp.	-	CP	-
AVES			
Phaethornithinae			
<i>Phaethornis ruber</i> (Linnaeus, 1758)	-	CN	PP
<i>Phaethornis superciliosus</i> (Linnaeus, 1766)	-	CN	PP
Trochilinae			
<i>Thalurania furcata</i> (Gmelin, 1788)	-	-	CN
<i>Polytmus theresiae</i> (Da Silva Maia, 1843)	-	-	CN
LEPIDOPTERA			
Nymphalidae			
<i>Heliconius hermathena</i> (Hewitson 1854)	-	PE	-
Indeterminada sp.1	-	PE	-
Indeterminada sp.2	-	CN	-
Sphingidae			
Indeterminada sp.1 (não capturada)	-	PE	-
Indeterminada Sp.2 (beija-flor, não capturada)	-	PE	-

Tabela 3. Frequência de visitantes em *Retiniphyllum schomburgkii*. F = freqüente (mais de uma visita a cada turno de observações); PF = pouco freqüente (uma visita a cada turno de observação); R = raro (uma a cinco visitas durante os períodos de observações); O = ocasionais (visitas freqüentes ou pouco freqüentes em determinados meses do ano).

Espécies	Classificação
APOIDEA	
Anthophoridae	
Centridini	
<i>Centris</i> sp.	F
Exomalopsini	
<i>Paratetrapedias flavipennis</i> (Smith, 1989) - macho	O
Xylocopini	
<i>Xilocopa</i> sp.1	O
<i>Xylocopa similis</i> (Smith, 1874)	O
<i>Xylocopa</i> sp.2	R
Apidae	
<i>Bombus</i> sp.	R
<i>Trigona</i> sp.1	F
<i>Plebeia</i> sp.	PF
<i>Melipona</i> sp.	R
<i>Trigona</i> sp.2	PF
Euglossini	
<i>Euglossa</i> sp. 2 – fêmea	F
<i>Euglossa viridis</i> (Perty, 1833)	O
<i>Euglossa</i> sp. 3	R
Halictidae	
<i>Augochloropsis</i> sp.	F
LEPIDOPTERA	
Nymphalidae	
<i>Heliconius hermathena</i>	O - R
Indeterminada sp.1	O
Sphingidae	
Indeterminada sp.1	R
Indeterminada sp.2. - mariposa-beija-flor	F
AVES	
<i>Polytmus theresiae</i> (Da Silva Maia, 1843)	O
<i>Phaethornis ruber</i> (Linnaeus, 1758)	O
<i>Thalurania furcata</i> (Gmelin, 1788)	R

Quando o número de flores de *R. schomburgkii* é mínimo (de fevereiro a maio), o principal visitante floral encontrado foi a borboleta *Heliconious hermathena* Hewitson 1854. Outras duas espécies de borboleta também realizaram algumas neste período, mas sua captura não pode ser realizada, e apenas o comportamento de uma delas pode indicar eventual polinização. Durante os meses com grande número de flores, *Heliconius hermathena*.

continuou a realizar visitas esporádicas. Mas o comportamento destas últimas não é de polinizadoras efetivas, pois não tocam o estigma em suas visitas as flores.

No início da manhã, entre às 4:30 e às 7:00 horas, uma espécie de mariposa-beija-flor (Indeterminada sp.2) realizou visitas. Seu comportamento de visita, porém, não foi totalmente esclarecido quanto à efetividade da polinização, pois esta espécie foi avistada apenas em três momentos, e suas visitas ocorreram muito rapidamente. Além disso, não foi possível a captura de nenhum indivíduo para comprovação de transporte e local de deposição de pólen.

Retiniphyllum speciosum

Na tabela 4 são mostrados os resultados de frequência de visitas a *R. speciosum*. *Phaethornis superciliosus* e *P. ruber* foram visitantes frequentes e potenciais polinizadoras desta espécie. Entre as abelhas, nenhuma espécie apresentou comportamento e tamanho condizentes com as características florais, porém *Xylocopa similis* pode ser considerada polinizador eventual. Esta espécie só foi vista em quatro momentos durante o período de observações. *Plebeia* sp., coletora de pólen, pode realizar eventualmente polinizações, dada a localização do pólen no estigma, quando comete “erros” e visita estigmas receptivos após ter visitado estigmas com carga polínica, servindo como vetor de pólen.

Os experimentos de acompanhamento de flores isoladas até a formação de frutos após serem visitadas não se mostraram eficientes para esta espécie, pois a frequência dos visitantes ocorria esporadicamente, em intervalos muitas vezes maiores que uma hora.

Tabela 4. Frequência de visitantes em *Retiniphyllum speciosum*. F = frequente; R = raro (visita em apenas uma a cinco vezes durante os períodos de observações).

Espécies	Classificação
Abelhas	
<i>Euglossa</i> sp.2	F
<i>Trigona</i> sp.1	F
<i>Melipona</i> sp.1	R
Aves	
<i>Phaethornis superciliosus</i> (Linnaeus, 1766)	F
<i>Phaethornis ruber</i> (Linnaeus, 1758)	F

5.4 Sistema reprodutivo

As três espécies são autocompatíveis e possuem altas taxas de frutificação em condições naturais (Tabela 1). Quanto a formação de frutos sem a presença de pólen (apomixia), foi apenas encontrada evidências para *R. speciosum*, em que houve formação de 28 frutos em flores emasculadas na fase de botão, de um total de 431 flores testadas (Tabela 1).

Tabela 5. Produção de frutos por *Retiniphyllum concolor*, *R. schomburgkii* e *R. speciosum*, após polinizações manuais, espontâneas e naturais controladas.

Espécies/ Tratamentos	<i>Retiniphyllum concolor</i>			<i>Retiniphyllum schomburgkii</i>			<i>Retiniphyllum speciosum</i>		
	Nº de flores	Nº de frutos formados	%	Nº de flores	Nº de frutos formados	%	Nº de flores	Nº de frutos formados	%
Polinização cruzada	132	97	73,48	136	14	10,29	225	128	56,89
Polinização geitonogâmica	93	60	64,52	95	28	29,47	160	136	85,00
Autopolinização espontânea	376	3	0,80	514	2	0,34	304	84	27,63
Polinização natural	264	186	70,45	253	70	27,67	259	214	82,63
Apomixia	20	0	0	20	0	0	431	28	6,50

Retiniphyllum concolor apresentou altas taxas de frutificação nos tratamentos de polinização cruzada (73,48%) e de polinização geitonogâmica (64,52%). Além disso, a polinização espontânea foi praticamente inexistente (com apenas três frutos formados em 376 flores acompanhadas) e nenhum fruto se formou na ausência de pólen.

Retiniphyllum schomburgkii também não apresentou formação de frutos por apomixia. Além disso, nos indivíduos em estudo, a formação espontânea de frutos foi quase nula (apenas 0,34% do total de 514 flores acompanhadas). Em contraste com *R. concolor*, esta espécie apresentou maior produção de frutos por geitonogamia (29,47%), do que por xenogamia (10,29%), sugerindo a ocorrência de algum tipo de incompatibilidade cruzada entre indivíduos da população. O comportamento do principal grupo de visitantes (abelhas de

médio porte) pode favorecer a reprodução geitonogâmica, pois em um episódio de visitas um único indivíduo pode visitar mais de 20 flores em uma mesma planta. Estas flores podem estar tanto na fase de apresentação de pólen quanto na fase de estigma receptivo, o que favoreceria a geitonogamia. Assim, *R. schomburgkii* foi considerada uma espécie auto-compatível não-apomítica.

Nas polinizações controladas, *R. speciosum* apresentou formação de frutos por xenogamia (58,89%), por geitonogamia (85,00%), autopolinização espontânea (27,63%) e por apomixia (6,5%). Esta foi a espécie que apresentou a maior taxa de formação de frutos em condições naturais (82,63%). Isso se deve provavelmente a possibilidade de conjugação de apomixia, autopolinização espontânea e as polinizações realizadas por diferentes vetores, tanto com pólen próprio como com pólen cruzado. A formação de frutos por geitonogamia, assim como em *R. schomburgkii*, foi superior a taxa de formação por xenogamia.

Pela razão P/O (Tabela 6), que representa o teste indireto do sistema reprodutivo, de acordo com a classificação de Cruden (1977), as três podem ser incluídas entre as espécies xenógamas facultativas, corroborando com o teste direto do sistema reprodutivo, em que houve formação de frutos, para as três espécies, tanto por geitonogamia como por xenogamia.

Tabela 6. Razão pólen/óvulo para *Retiniphyllum concolor*, *R. schomburgkii* e *R. speciosum*.

Espécie	Razão P/O
<i>R. concolor</i>	735±34
<i>R. schomburgkii</i>	712±23
<i>R. speciosum</i>	675±46

5.5 Isolamento reprodutivo

Houve formação de frutos por hibridação nos seis tratamentos conduzidos neste estudo (Tabela 7). Nos dois tratamentos em que *R. concolor* atuou como receptor e no tratamento em que *R. speciosum* recebeu pólen de *R. concolor*, a formação de frutos foi >

40%, mesmo considerando a possível contribuição da apomixia na produção de frutos em *R. speciosum*.

Os cruzamentos tendo *R. schomburgkii* como receptor de pólen apresentaram sucesso de frutificação menor do que os demais, o que é consistente com a menor fertilidade desta espécie nos testes de polinizações intraespecíficas. Como doador de pólen, *R. schomburgkii* apresentou alta eficiência na formação de frutos em *R. concolor* (56%) e relativamente baixa (19%) em *R. speciosum*.

Tabela 7. Produção de frutos após polinizações experimentais híbridas com *Retiniphyllum concolor*, *R. schomburgkii* e *R. speciosum*. Entre parênteses ao lado dos valores de porcentagem nos cruzamentos em que *R. speciosum* é o receptor, valores sem a taxa de agamospermia encontrada.

Tratamento (receptor x doador)	Nº de flores polinizadas	Nº de frutos formados	%
<i>R. concolor</i> X <i>R. schomburgkii</i>	118	66	55,93
<i>R. concolor</i> X <i>R. speciosum</i>	127	60	47,24
<i>R. schomburgkii</i> X <i>R. concolor</i>	118	13	11,02
<i>R. schomburgkii</i> X <i>R. speciosum</i>	194	35	18,04
<i>R. speciosum</i> X <i>R. concolor</i>	142	69	48,59 (42,09)
<i>R. speciosum</i> X <i>R. schomburgkii</i>	135	26	19,26 (12,76)

A taxa de frutificação nos dois tratamentos em que *R. speciosum* atuou como receptor de pólen podem apresentar um resultado que não corresponde a realidade, uma vez que esta espécie apresentou formação de frutos sem a presença de pólen. Subtraindo-se desta porcentagem o valor encontrado para a formação de frutos por agamospermia para esta espécie (6,5%), nos cruzamentos entre *R. speciosum* x *R. concolor* e *R. speciosum* x *R. schomburgkii*, temos, respectivamente: 42,09% e 12,76%.

5.6 Germinação e propagação vegetativa

No experimento de germinação de sementes provenientes do teste do sistema reprodutivo de cada uma das espécies nenhuma germinou, mesmo quando aplicada a tentativa de quebra de dormência com imersão em água quente. No segundo experimento (com sementes híbridas), metade das sementes (cinco) do tratamento híbrido entre *R. concolor* (receptor) e *R. speciosum* (doador) germinaram submetidas ao mesmo processo, mas nenhuma plântula se desenvolveu, ficando os cotilédones envoltos pela testa das sementes após a germinação (Figura 9). As sementes germinaram por volta de uma semana após o plantio e as plântulas permaneceram vivas por apenas 4-8 dias.



Figura 9. Plântula híbrida do cruzamento entre *Retiniphyllum concolor* e *R. speciosum*, com quatro dias. Em destaque, seta indicando a testa da semente envolvendo os cotilédones.

Clones de indivíduos da espécie *R. schomburgkii* são facilmente encontrados em campo. Eles são originários de propagação vegetativa por estolões. No período mais seco (principalmente no mês de outubro), vários indivíduos secaram ao mesmo tempo em que surgia nas proximidades um novo, com um estolão fazendo a ligação entre eles.

6. DISCUSSÃO

6.1 Fenologia de floração

Retiniphyllum concolor, *R. schomburgkii* e *R. speciosum* apresentaram florações longas e com produção de grande quantidade de flores. O pico de floração para *R. concolor* e *R. schomburgkii* ocorreu nos meses com os períodos normalmente mais secos. Em *R. speciosum*, ocorreram três picos principais, mas todos eles dentro do período em que as chuvas são menos frequentes (junho, agosto e outubro). Uma das hipóteses apontadas para a ocorrência de floração na estação seca entre espécies tropicais de ambientes com estresse hídrico é de que seria uma adaptação para redução dos efeitos desse estresse, pela queda foliar que ocorre neste período (Borchert, 1983; Bawa *et al.* 2003). Outra possível causa diz respeito à dinâmica da população dos polinizadores, que seriam mais abundantes nesta estação em tais ambientes (Janzen, 1967; Bawa *et al.*, 2003). T *et al.* (2006) em vegetação de Cerrado, encontraram maior proporção de espécies com flores em duas épocas: no final da estação seca e início da chuvosa e final da estação chuvosa e início da seca, e em ambiente de campo úmido, as maiores proporções foram a partir da metade da estação chuvosa até o início da estação seca.

Para espécies de Rubiaceae da Mata Atlântica estudos apontam uma situação diferente, com floração na estação chuvosa. Martin-Gajardo e Morellato (2003), encontraram sete de dez espécies com flores este período e Pereira *et al.* (2006), descrevem quatro espécies. Vale destacar que no primeiro estudo, durante o ano inteiro havia pelo menos uma espécie em floração. Outros estudos na Mata Atlântica (Takahasi, 1998; Morellato *et al.*, 2000) relataram dados de floração apenas durante o pico da estação chuvosa, de outubro a fevereiro. Bawa *et al.* (2003) em seus estudos sobre fenologia de espécies arbóreas, em floresta tropical úmida, na Costa Rica, apontaram picos de floração em uma primeira estação

chuvosa (em julho) e menor número de espécies florescendo na segunda estação chuvosa, com maior incidência de chuvas.

A floração das espécies estudadas se sobrepõem ao longo do ano e apresenta apenas pequenas diferenças nos picos de produção de flores. Desta forma, a fenologia reprodutiva não representa uma barreira pré-zigótica. A sobreposição na floração de espécies congênicas e simpátricas pode interferir no isolamento reprodutivo das espécies (Paun *et al.*, 2009), principalmente pela possibilidade de ocorrência de cruzamentos interespecíficos em espécies que não apresentem outras barreiras pré-zigóticas eficientes. Os longos períodos de floração das três espécies congêneres e a grande sobreposição temporal entre eles permitem, a princípio, polinizações naturais interespecíficas entre elas, caso compartilhem os mesmos polinizadores.

Os indivíduos de *R. schomburgkii* que ocorrem em ambientes com perturbações naturais ou antrópicas apresentaram maior número de flores e um período maior de floração do que os que ocorrem em campinarana fechada. Estudos com a fenologia de diferentes espécies (e.g., Wilken, 1977; Pollard e Briggs, 1982; Sultan, 2001; Stinchombe *et al.*, 2004; Wolfe e Mazer, 2005; Neil e Wu, 2006; Campbell e Snow, 2007; Williams *et al.*, 2008; Levin, 2009) indicam que o período de floração pode ser alterado pelas condições ambientais, como por exemplo, umidade, luz e/ou quantidade de nutrientes, e também por distúrbios antropogênicos ou de origem natural. Além disso, o melhor desempenho desta espécie em áreas abertas pode indicar que a espécie é pioneira.

6.2 Morfologia e biologia floral

As diferenças encontradas na morfologia e biologia floral (tamanho, posicionamento na inflorescência, cor, odor...) das três espécies podem ter potencializado a visita de diferentes grupos de polinizadores. Durante as observações, visitantes compartilhados por pelo menos duas delas foram vistos com frequência. Além disso, *Euglossa* spp. realizou visitas às flores das três espécies para coleta de néctar. *Retiniphyllum schomburgkii* e *R. speciosum* compartilharam beija-flores como visitantes florais. A competição por

polinizadores parece ser freqüente em espécies relacionadas, pela semelhança nas características florais e nos períodos de floração. Para que ocorra um isolamento reprodutivo completo em espécies simpátricas e congênicas, seria necessário que o período da receptividade do estigma apresentasse uma divergência temporal entre as espécies (Levin, 1971; Wendt *et al.*, 2002), situação não encontrada nas espécies investigadas no presente estudo.

A simetria floral de *R. concolor* e *R. schomburgkii* apresentou-se ligeiramente zigomorfa, pelo posicionamento e curvatura do estilete. As pressões seletivas que levam ao aparecimento da zigomorfia poderiam ter relação com agentes de vetores de pólen com simetria bilateral (Proctor, 1978) e frequentemente estão associadas a sistemas de polinização mais especializados (Ramirez, 2003). Este tipo de morfologia é também muitas vezes relacionado a flores visitadas por abelhas, e poderia ter direcionado a visitação em *R. concolor* e *R. schomburgkii*, que apresentaram abelhas como os principais visitantes e vetores de pólen.

O comprimento do tubo da corola é maior em *R. speciosum* ($31,62 \pm 1,51$ mm) e menor em *R. schomburgkii* ($8,78 \pm 1,58$). Isto provavelmente reflete o grupo de polinizador principal para cada espécie: a primeira foi visitada predominantemente por beija-flores Phaethornithinae, e a segunda, principalmente por abelhas de médio porte como *Centris* sp. Além disso, o tubo da corola de *R. schomburgkii* apresenta um alargamento no ápice e listras de cor rosada, que poderiam funcionar como guias de néctar para abelhas.

A ocorrência de apresentação secundária de pólen em *Retiniphyllum* do tipo estilar é bastante conhecida, porém poucas espécies do gênero foram estudadas detalhadamente quanto a sua biologia floral e reprodutiva e quais as implicações para a polinização. Lasprilla (2003) relata que os lobos da corola estão diretamente envolvidos no processo em que ocorre a transferência do pólen das anteras para o estigma em *Retiniphyllum rhabdocalyx* Müll. Arg. Esse processo parece ocorrer também em *R. concolor*, *R. schomburgkii* e *R. speciosum*, e provavelmente nas outras espécies deste grupo.

A secreção de néctar em *R. concolor* foi maior no segundo dia ($13,46 \pm 5,25$ μ l). Em *R. schomburgkii* e *R. speciosum* apresentaram padrões semelhantes, com um pico de secreção no terceiro dia ($4,92 \pm 5,88$ e $24,43 \pm 9,25$ μ l, respectivamente). Para as três espécies, o início da receptividade do estigma coincide com a máxima produção de néctar. Em relação à

concentração, *R. concolor* e *R. speciosum* apresentaram os maiores valores de açúcar no primeiro dia (cerca de 28% e 23%, respectivamente) e um decréscimo progressivo nos dias seguintes (cerca de 7 % para ambas espécies no último). Por sua vez *R. schomburgkii* apresentou maior concentração no segundo dia (cerca de 36%), antes mesmo da separação total do lobos estigmáticos, fato de difícil interpretação.

6.3 Polinização

As flores das três espécies receberam visitas de uma ampla gama de tipos de visitantes, porém, como já proposto por Bawa (1990), Bawa *et al.* (1985) e Schemske e Horvitz (1984), foram polinizadas preferencialmente por determinados grupos de visitantes particulares. Isso não significa que, eventualmente, visitantes não especializados e oportunistas não possam atuar como vetores de pólen ocasionais, efetivando a polinização, como observado neste estudo. Entretanto, a participação destes agentes no sucesso reprodutivo normalmente é avaliada de forma negativa, isto é, qual a parcela de participação destes agentes como pilhadores. Neste sentido, as espécies de visitantes que foram compartilhadas entre as espécies de *Retiniphyllum*, mesmo quando aparentemente não adaptadas à visita, poderiam ocasionalmente ter atuado como vetores de pólen.

Em diversos casos, os polinizadores podem atuar como agentes de isolamento reprodutivo entre populações (Kiestler *et al.*, 1984) quando visitam preferencialmente flores com caracteres específicos dentro de uma população qualquer. Desta forma, o sucesso reprodutivo destas espécies é superior, favorecendo a manutenção de genes específicos, que podem levar no longo prazo, à diferenciação, com o surgimento de barreiras reprodutivas.

Fenster *et al.* (2004) propuseram, subjetivamente, uma classificação em que aquelas espécies de plantas que eram visitadas por três quartos ou mais do tempo por um único grupo funcional eram consideradas especializada nesse grupo. Seguindo esta classificação, *R. speciosum* poderia ser classificada dentro da síndrome de ornitofilia. Para *R. schomburgkii*, porém, considerando que houve diferenças nas taxas de visita ao longo do ano, somente poderia ser classificada na síndrome de melitofilia em parte do período em que havia maior

número de visitas efetivas realizadas por abelhas de tamanho médio (principalmente *Euglossa* spp. e *Centris* sp.). Este período coincidiu com o auge da floração, ou seja, nos meses de julho a agosto.

O processo de abertura acelerado por visitantes florais como encontrado para a espécie *R. concolor* poderia ser considerado benéfico para o sucesso reprodutivo da espécie, uma vez que a liberação de pólen ocorre antes da sua exposição pelo movimento do corola, mas somente quando realizado por vetores efetivos de pólen, como no caso da *Euglossa* sp.1

A baixa taxa de formação de frutos espontaneamente (0,80%) aliada a ausência de apomixia em *R. concolor* sugere grande dependência do polinizador efetivo (abelha *Euglossa* sp.1) na produção de frutos, apesar da espécie ser autocompatível, formando frutos no tratamento geitonogâmico (64,52%).

6.4 Sistema Reprodutivo

Em *Retiniphyllum concolor* e *R. schomburgkii* a ausência de apomixia e a baixa formação de frutos espontaneamente indicam que a ação dos visitantes florais é provavelmente essencial para o sucesso reprodutivo. No entanto, as três espécies foram visitadas por agentes com comportamento que promovem a polinização geitonogâmica, com repetidas visitas às flores de um único indivíduo, em uma seção de visitação. Podem se abrir, nestas espécies, mais de 20 flores por indivíduo/dia e estas normalmente permanecem receptivas por mais de dois dias, com produção de néctar quase constante durante todo este período (seção 4.2). Estes fatores, juntamente com a aparente ausência de mecanismos de autoincompatibilidade, devem resultar em produção de progênies altamente autógamas nestas espécies. Análises genéticas das progênies, no entanto, são necessárias para se confirmar esta hipótese levantada com base nas observações ecológicas e nos testes de polinização manual.

Em *R. schomburgkii* *R. speciosum* a taxa de geitonogamia maior que xenogamia poderia sugerir ocorrência de incompatibilidade entre alguns indivíduos da população. Em *R. speciosum* óvulos se desenvolveram formando sementes espontaneamente. Esse resultado

contrasta com o encontrado para *R. concolor* e *R. schomburgkii*. *R. rhabdocalyx*, estudada por Lasprilla (2003), também foi considerada alógama, pois não apresentou frutos nos testes de autopolinização espontânea. A origem e continuidade da reprodução endogâmica, apesar das consequências genéticas negativas do ponto de vista evolutivo, como acúmulo de mutações deletérias e limitação da variabilidade genética, continua sendo um fenômeno desafiador para os biólogos evolucionistas (Bell, 1982; Sharbel *et al.*, 2009). A autopolinização e a apomixia podem ser agentes desencadeadores de eventos de especiação (Judd *et al.*, 2009), por atuarem na manutenção de genes específicos dentro de subpopulações isoladas. Salomão e Allem (2001) estudaram 75 espécies lenhosas do cerrado das quais 14 apresentaram poliembrião, representando quase 20% do total, e que pertenciam a 12 famílias de angiospermas, entre elas *Genipa americana* L., (Rubiaceae). Para as espécies deste estudo, mais experimentos são necessários para a elucidação da possível atuação desses eventos nas questões evolutivas relacionadas a sua coexistência.

Alguns estudos apontam que as espécies alógamas ocorrem em maior número em relação às autógamas entre as espécies arbóreas tropicais (Bawa e O'Malley, 1985; Murawski, *et al* 1990; Murawski, 1995). A hipótese de que a densidade populacional baixa poderia ser relacionada com o aumento da autogamia apontado por alguns autores (Solbrig, 1979; Antonovics e Levin, 1980) não pode explicar o caso de *R. concolor*, *R. schomburgkii* e *R. speciosum*, uma vez que essas espécies ocorrem em grandes populações nos locais de estudo (observação pessoal). Para Levin (1992) a escassez de polinizadores poderia ser a limitação que leva as espécies se tornarem autógamas. Este fator, da mesma forma que o anterior, também não pode ser aplicado para explicar o que ocorre com as três espécies, uma vez que muitos visitantes florais com características que sugerem de polinizadores efetivos foram vistos durante as observações, apesar de a qualidade do serviço de polinização não ter sido avaliada para a maioria destas espécies.

A autocompatibilidade e a adaptação a autofertilização ocorrem em populações de plantas que se encontram restritas à “periferia” de abrangência das espécies, por pressões ambientais (Brown, 1984; Sagarin e Gaines, 2002; Busch, 2005), tais como baixa quantidade de polinizadores ou de indivíduos da mesma espécie. A autocompatibilidade também é registrada frequentemente em ilhas (Busch, 2005). Esta segunda condição poderia, sugestivamente, ser a possível causa das espécies deste estudo apresentarem esta característica reprodutiva, uma vez que as campinas e campinaranas muitas vezes são

pequenas formações isoladas (tipo mosaico) inseridas em uma matriz de floresta tropical ombrófila.

Em estudo com 21 espécies de *Psychotria*, Rubiaceae, coexistentes em duas áreas de floresta chuvosa sazonal, Sakai e Wright (2008) sugerem que exista uma diferença nos níveis de flores capazes de se autopolinizar entre espécies heterostílicas e monomórficas: as monomórficas apresentariam níveis maiores de produção de frutos em experimentos utilizando flores ensacadas para verificação de formação de frutos, sem verificação experimental da ocorrência de apomixia. As populações de ilhas ilustram a possibilidade de perda da heterostilia, relacionada com maior probabilidade de autopolinização (Sakai e Wright, 2008). Não foram, porém, encontrados registros sobre o caminho evolutivo da monomorfia em *Retiniphyllum*.

Nas espécies que apresentam ASP do tipo estilar, o fato de o pólen ser posicionado no estigma também pode ser um fator eventual que leva a autofertilização (Yeo, 1993), principalmente na ausência de vetores de pólen, o que explicaria a alta taxa de formação de frutos para as espécies deste estudo, principalmente *R. concolor* e *R. speciosum*.

Retiniphyllum speciosum foi a única que apresentou indicativos da ocorrência de apomixia. Em taxa de florestas tropicais, este fenômeno, segundo Baker *et al.* (1983), poderia ser relacionado a escassez de polinizadores ou ainda por servir como uma barreira a heterozigose dos cruzamentos antigos. Para que haja produção de sementes por apomixia em plantas anfimíticas, são normalmente necessários três estádios de desenvolvimento: (1) formação de um saco embrionário não reduzido, *e.g.*, através da formação de um megásporo meioticamente não reduzido (apomeiose), (2) desenvolvimento de um embrião de um óvulo não fertilizado e não reduzido (partenogênese), (3) e formação de um endosperma funcional, *e.g.*, fertilização da célula binucleada central (pseudogamia) (Sharbel *et al.*, 2009). Para o presente estudo, não foi determinado a forma de ocorrência em *R. speciosum*.

Quanto a propagação vegetativa por estolões encontrada em *R. schomburgkii*, acredita-se que as duas outras espécies do estudo também possam apresentar este tipo de crescimento, pois muitas vezes ocorrem aglomerados, porém esta situação não foi avaliada em ambas.

A formação de sementes em todos os tratamentos de hibridação indica que as espécies podem não estar totalmente isoladas por barreiras pré-zigóticas. Uma dada espécie de planta

pode estar isolada das demais por vários tipos de barreiras pré-zigóticas e pós-zigóticas e suas interações complexas (Coyne e Orr, 2004). Alguns estudos sugerem que mecanismos de isolamento pré-zigóticos são mais fortes na prevenção da hibridação do que os pós-zigóticos, por seleção dos indivíduos jovens (Rieseberg e Willis, 2007; Lowry *et al.*, 2008; Widmer *et al.*, 2009; Paun, 2009). Este não parece ser o caso do presente estudo, onde a formação de frutos e sementes por meio de polinizações controladas interespecíficas é comum e apresenta taxas similares ao das polinizações controladas intraespecíficas.

É provável que, em condições naturais, uma proporção considerável de sementes seja formada por polinizações interespecíficas, dada a longa sobreposição nos períodos de floração, o compartilhamento de polinizadores e a aparente ausência de barreiras de compatibilidade pré-zigótica entre espécies. Caso não ocorram híbridos naturais adultos dentro desta população, uma possível explicação seria a ocorrência de problemas de desenvolvimento após a dispersão das sementes, quando genes importantes poderiam atuar no processo de germinação e desenvolvimento das plântulas. Estudos adicionais, em áreas de ecologia, citogenética e ontogenia, envolvendo estádios posteriores do desenvolvimento das sementes híbridas, devem se realizar para esclarecimento desta questão.

A formação de frutos nos cruzamentos interespecíficos sugere que as três espécies não estão totalmente isoladas reprodutivamente. *Retiniphyllum concolor* parece não possuir barreiras pré-zigóticas eficientes para pólen das outras duas espécies do mesmo gênero, o mesmo ocorrendo para *R. speciosum* quando recebe pólen de *R. concolor* pois a formação de frutos nestes três tratamentos foi superior a 40%.

7. CONCLUSÃO

A floração de *R. concolor*, *R. schomburgkii* e *R. speciosum* se sobrepõe ao longo do ano, com picos de emissão ocorrendo individualmente, mas em certas épocas a sincronia de todas as espécies é muito alta. As inflorescências podem possuir simultaneamente flores apresentando pólen ou receptivas em cada uma das três, fator que favorece as polinizações geitonogâmicas.

As flores divergem no tamanho, coloração, quantidade total de açúcar e volume do néctar produzido, o que pode favorecer a visitação por grupos divergentes. A apresentação do pólen secundariamente (tipo estilar) ocorre anteriormente à receptividade do estigma, caracterizando a protandria. A antese é longa e dura de quatro a sete dias, dependendo da espécie. Liberação de odor ocorre apenas em *R. concolor* e *R. schomburgkii*, espécies visitadas principalmente por insetos.

Retiniphyllum concolor apresentou menor número de visitantes e relação mais estreita com o vetor de pólen, sendo *Euglossa* sp.1 seu principal polinizador. *R. schomburgkii*, por sua vez, recebeu mais visitantes e foi polinizada por um maior número de espécies. *R. speciosum* foi polinizada principalmente por beija-flores, e as características florais a enquadram na síndrome de ornitofilia. Nas três espécies, as visitas ocorrem ao longo do decorrer do dia, exceto a noite, apesar de as flores permanecerem abertas neste período. Existe sobreposição de visitantes, possíveis vetores de pólen híbrido entre as espécies, mas as flores são polinizadas, frequentemente, por grupos divergentes.

Todas as três espécies apresentaram altas taxas de frutificação em condições naturais e são autocompatíveis, gerando sementes em polinizações geitonogâmicas, inclusive em maiores proporções do que em polinizações xenogâmicas em *R. schomburgkii* e *R. speciosum*. *R. speciosum* apresenta também, em pequena proporção, frutos de origem apomítica.

Os cruzamentos interespecíficos geram sementes híbridas, sugerindo que as três espécies não apresentam barreiras eficientes para o pólen das espécies congêneras, porém a existência de híbridos naturais na área de estudo não foi investigada, e existe a possibilidade de ocorrência de barreiras pós-zigóticas atuando no isolamento destas espécies.

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que as espécies *Retiniphyllum concolor*, *R. schomburgkii* e *R. speciosum* que ocorrem em simpatria em campinaranas rochosas no município de Presidente Figueiredo, não apresentam barreiras pré-zigóticas eficientes, gerando frutos em polinizações híbridas.

Os dados deste estudo indicam que, apesar da formação de frutos e sementes ser bem sucedida nos cruzamentos interespecíficos, o mau funcionamento de genes atuantes nos processos de germinação e desenvolvimento dos embriões/plântulas híbridas podem na prática inviabilizar o recrutamento de indivíduos híbridos nas populações estudadas em condições naturais. Estudos ecológicos e genéticos mais detalhados sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas híbridas e não-híbridas, no entanto, são necessários para melhor esclarecimento desta questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allard, R.W. 1975. The mating system and microevolution. *Genetics*, 79:115-126.
- Allem, A.C. 2004. Optimization theory in plant evolution: an overview of long-term evolutionary prospects in the Angiosperms. *The Botanical Review*, 69 (3): 225-251.
- Anderson, A.B. 1978. *Aspectos florísticos e fitogeográficos de campinas e campinaranas na Amazônia Central*. Dissertação (mestrado), INPA/UFAM, Manaus. 83pp.
- Antonovics, J.; Levin, D.A.. 1980. The ecological and genetic consequences of density-dependent regulation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 11: 411-452.
- Arnold, M.L. 1997. *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford Univ. Press, Oxford. 212pp.
- Baker, H.G.; Bawa, K.S.; Frankie, G.W.; Opler, P.A. 1983. Reproductive biology of plants in tropical forests. In: Golley, F. B. (Ed.), *Tropical rain forest ecosystems: structure and function*. Elsevier, Amsterdam. p. 183-215
- Barret, S.C.H. 1985. Floral polymorphism and monomorphism in continental and island populations of *Eichornia paniculata* (Spreng.) Solms. (Pontederiaceae). *Biological Journal of Linnean Society*, 25: 41-60.
- Barreto, A.A.; Freitas, L. 2007. Atributos florais em um sistema de polinização especializado: *Calathea cylindrica* (Roscoe) K. Schum. (Marantaceae) e abelhas Euglossini. *Revista Brasileira de Botânica*, 30 (3): 421-431.
- Bawa, K.S. 1990. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 21: 399-422.
- Bawa, K.S.; Kang, H.; Grayum, M.H. 2003. Relationships among time, frequency, and duration of flowering in tropical rain forest trees. *American Journal of Botany*, 90 (6): 877-887.

- Bawa, K.S.; O'Malley, D.M. 1985. Estudios geneticos y sistemas de cruzamiento en algunas especies arboreas de bosques tropicales. *Revista de Biologia Tropical*, 35: 177-188.
- Bawa, K.S.; Perry, D.R.; Bullock, S.H.; Coville, R.E.; Grayum, M.H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination mechanisms. *American Journal of Botany*, 72 (3): 346-356.
- Bell, G. 1982. *The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality*. University of California Press, Berkeley, USA. 245pp.
- Bencke, C.S.C.; Morellato, L.P. 2002. Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Revista Brasileira de Botânica*, 25 (3): 269-275.
- Borchert, R. 1983. Phenology and control of flowering in tropical trees. *Biotropica*, 15: 81-89.
- Bower, C.C. 1996. Demonstration of Pollinator-Mediated Reproductive Isolation in Sexually Deceptive Species of *Chiloglottis* (Orchidaceae: Caladeniinae). *Australian Journal of Botany*, 44 (1): 15 – 33.
- Brown, J.H. 1984. On the relationship between abundance and distribution of species. *American Naturalist*, 124: 255–279.
- Busch, J.W. 2005. The evolution of self-compatibility in geographically peripheral populations of *Leavenworthia alabamica* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 92 (9): 1503–1512.
- Campbell, L.G.; Snow, A.A. 2007. Competition alters life history and increases the relative fecundity of crop–wild radish hybrids (*Raphanus* spp.). *New Phytologist*, 173: 648–660.
- Carman, J.G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society*, 61: 51-94.
- Coelho, C.P.; Barbosa, A.A.A. 2004. Biologia reprodutiva de *Psychotria poeppigiana* Müll. Arg. (Rubiaceae) em mata de galeria. *Acta Botanica Brasilica*, 18 (3): 481-489.
- Colaço, M.A.S.; Fonseca, R.B.S.; Lambert, S.M.; Costa, C.B.N.; Machado, C.G.; Borba, E.L. 2006. Biologia reprodutiva de *Melocactus glaucescens* Buining e Brederoo e *M.*

- paucispinus* G. Heimen e R. Paul (Cactaceae), na Chapada Diamantina, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 29 (2): 239-249.
- Correia, M.C.R.; Pinheiro, M.C.B.; Lima, H. A. 2005. Biologia floral e polinização de *Arabidaea conjugata* (Vell.) Mart. – Bignoniaceae. *Acta Botanica Brasilica*. 19: 501-510.
- Cortés-B., R.; Delprete, P.G.; Motley, T.J. 2009. Phylogenetic placement of the tribe Retiniphyllae among the subfamily Ixoroideae (Rubiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96: 61–67.
- Coyne, J.A.; Orr, H.A. 2004. Polyploidy and hybrid speciation. *In*: Coyne, J. A., Orr, H. A., (Eds.) *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. p. 321–351.
- Cruden, R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 31: 32-46
- Dafni, A. 1992. *Pollination ecology: a practical approach*. Oxford University Press, New York. 272pp.
- Delprete, P.G.; Cortés-B, R. 2004. A preliminary phylogenetic study of the tribe Sipaneeae (Rubiaceae, Ixoroideae), using trnL-F and ITS sequence data. *Taxon*, 53: 347–356.
- Ellstrand, N.C.; Whitkus, R.; Rieseberg, L.H. 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 5090–5093.
- Faegri, K.; Van Der Pijl, L. 1979. *The principles of pollination ecology*. 3rd Ed Pergamon Press, Oxford. 244pp.
- Fenster, C.B.; Armbruster, W.S.; Wilson, P.; Dudash, M.R.; Thomson, J.D. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 35: 375-403.
- Fournier, L.A. 1974. Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. *Turrialba*, 24: 422-423.
- Galliot, C.; Stuurman, J.; Kuhlemeier, C. 2006. The genetic dissection of floral pollination syndromes. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 78-82.
- Ganders, F.R. 1975. Heterostyly, homostyly, and fecundity in *Amsinckia spectabilis* (Boraginaceae). *Madrono*, 23(5): 6-62.

- Graham, J.H.; Freeman, D.C.; McArthur, E.D. 1995. Narrow hybrid zone between twosubspecies of big sagebrush (*Artemisia tridentata*: Asteraceae). II. Selection gradients and hybrid fitness. *American Journal of Botany*, 82: 709–16.
- Herrera, C.M. 1996. Floral traits and plant adaptation to insect pollinators: a devil's advocate approach. In: D.G. Lloyd; S.C.H. Barrett (Eds.). *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants*. Chapman and Hall, New York. p. 65-87.
- Heslop-Harrison, Y.; Shivanna, K.R. 1977. The receptive surface of the Angiosperm stigma. *Annals of Botany*. 41(176): 1233-1258.
- Howarth, D.G.; Baum, D.A. 2005. Genealogical evidence of homoploid hybrid speciation in an adaptive radiation of *Scaevola* (Goodeniaceae) in the Hawaiian islands. *Evolution*, 59: 948–961.
- Howell, G.J.; Slater, A.T; Knox, R.B. 1993. Secondary pollen presentation in Angiosperms and its biological significance. *Australian Journal of Botany*, 41: 417–438.
- Huber, O. 1995. Geographical and physical features. In: P.E. Berry, B.K. Holst e K. Yatskievych (Eds.). *Flora of the Venezuelan Guayana*. Timber Press, Portland. p.1-51.
- Janzen, D.H. 1967. Synchronization of sexual reproduction of trees within the dry season in Central America. *Evolution*, 21: 620-637.
- Johnson, S.D.; Steiner, K.E. 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution*, 15:140-143.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F.; Donoghue, M.J. 2009. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. 3 Ed. Porto Alegre: Artmed. 612pp.
- Karrenberg, S.; Lexer, C.; Rieseberg, L.H. 2007. Reconstructing the History of Selection during Homoploid Hybrid Speciation. *The American Naturalist*, 169: 725–737.
- Kearns, C.A.; Inouye, D.W. 1993. *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, Niwot. 583pp.
- Kiester, A.R.; Lande, R.; Schemske, D.W. 1984. Models of coevolution and speciation in plants and their pollinators. *American Naturalist*, 124: 220–43.
- Koltunow, A.M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell*, 5: 1425-1437.

- Köppen, W. 1948. *Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra*. Fondo de Cultura Econômica. México. 479pp.
- Küppers, H.D. 1999. *DuMont's Farbenatlas*. Dumont Buchverlag, Köhn. 165p.
- Lasprilla, L.R. 2003. *Interações planta/beija-flor em três comunidades vegetais da parte sul do Parque Nacional Natural Chiribiquete, Amazonas (Colômbia)*. Tese de doutorado – Instituto de Biologia, Universidade de Campinas. 123pp.
- Lasprilla, L.R.; Sazima M. 2002. Polinización de *Retiniphyllum speciosum* (Spruce ex Benth.) Muell. Arg. (Rubiaceae) un caso especial con presentación secundaria de polen en el estigma mediada por colibríes. *Anais do VIII Congresso Latinoamericano de Botânica*, Cartagena. p. 197.
- Levin, D.A. 1979. The nature of plant species. *Science*, 204: 381–384.
- Levin, D.A. 2000. *The Origin, Expansion, and Demise of Plant Species*. Oxford Univ. Press, New York. 167pp.
- Levin, D.A. 2009 . Flowering-time plasticity facilitates niche shifts in adjacent Populations. *New Phytologist*, 183: 661–666.
- Levin, D.A. Berube, D.E. 1972. *Phlox* and *Colias*: the efficiency of a pollination system. *Evolution*, 26: 242-250.
- Levin, D.A. 1971. The origin of reproductive isolating mechanisms in flowering plants. *Taxon*, 20 (1): 91-113.
- Lowe, A.J.; Abbott, R.J. 2004. Reproductive isolation of a new hybrid species, *Senecio eboracensis* Abbott e Lowe (Asteraceae). *Heredity*, 92: 386–395.
- Lowry, D.B.; Modliszewski, J.L.; Wright, K.M.; Wu, C.A.; Willis, J.H. 2008. The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 363: 3009–3021.
- MacBreen, K.; Lockhart, P.J. 2006. Reconstructing reticulate evolutionary histories of plants. *Trends in Plant Science*, 11(8): 398-404.
- Martin-Gajardo, I.S.; Morellato, L.P.C. 2003. Fenologia de Rubiaceae do sub-bosque em Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 26: 299-309.
- McDade, L. 1990. Hybrids and phylogenetic systematics. I. Patterns of character expression in hybrids and their implications for cladistic analysis. *Evolution*, 44: 1685-1700.

- Medel, R.; Valiente, A.; Botto-Mahan, C.; Carvallo, G.; Perez, F.; Pohl, N.; Navarro, L. 2007. The influence of insects and hummingbirds on the geographical variation of the flower phenotype in *Mimulus luteus* *Ecography*, 30: 812-818.
- Morellato, L.P.C., Talora, D.C., Takahasi, A., Bencke, C.C., Romera, E.C. E Zipparro, V.B. 2000. Phenology of Atlantic rain forest trees: a comparative study. *Biotropica*, 32:811-823.
- Motley, T.J.; Wurdack, K.J.; Delprete, P.G. 2005. Molecular systematics of the Catesbaeeae-Chiococceae complex (Rubiaceae): flower and fruit evolution and biogeographic implications. *American Journal of Botany*, 92 (2): 316-329.
- Murawski, D.A. 1995. Reproductive biology and genetics of tropical trees from a canopy perspective. In: Lowman, M.D.; Nadkarni, N.M. (Eds). *Forest canopies*. Academic Press, San Diego, CA, USA. p. 457-493.
- Murawski, D.A.; Hamrieh, J.L.; Hubbell, S.P.; Foster, R.B. 1990. Mating systems of two bombacaceous trees of a neotropical moist forest. *Oecologia*, 82: 501-506.
- Naumova, T.N. 1993. *Apomixis in angiosperms: nucellar and integumentary embryony*. CRC Press, Boca Raton, FL. 278pp.
- Naumova, T.N. 2008. Apomixis and Amphimixis in Flowering Plants. *Cytology And Genetics*, 42 (3) 179–188.
- Nava, D.B.; Monteiro, E.A.; Correia, M.C.; Araújo, M.R.; Sampaio, R.R.L.; CAMPOS, G.S. 1998. Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais/CPRM. *Sócio-Economia do Município de Presidente Figueiredo*, Amazonas. 63pp.
- Neil, K.; Wu, J. 2006. Effects of urbanization on flowering plant phenology: a review. *Urban Ecosystems*, 9: 243–275.
- Pacini, E.; Hesse, M. 2004. Cytophysiology of pollen presentation and dispersal. *Flora Review*. 199: 273–285.
- Pascarella, J.B. 2007. Mechanisms of prezygotic reproductive isolation between two sympatric species, *Gelsemium rankinii* and *G. sempervirens* (Gelsemiaceae), in the southeastern United States. *American Journal of Botany*, 94(3): 468–476.
- Paun, O.; Forest, F.; Fay, M.F.; Chase, M.W. 2009. Hybrid speciation in angiosperms: parental divergence drives ploidy. *New Phytologist*, 182: 507–518.

- Pauw, A. 2005. Inversostyly: a new styler polymorphism in an oil-secreting plant, *Hemimeris racemosa* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*, 92: 1878-1886.
- Pereira, Z.V.; Vieira, M.F.; Carvalho-Okano, R.M. 2006. *Revista Brasileira de Botânica*, 29(3): 471-480.
- Peres, S.C.J.G.A. 2004. Envoltórios. In: Ferreira, A.G. e Borghetti, F (Orgs). *Germinação, do básico ao aplicado*. Artimed, Porto Alegre. 132pp.
- Pollard, A.J.; Briggs, D. 1982. Genecological studies of *Urtica dioica* L. I. The nature of intraspecific variation in *U. dioica*. *New Phytologist* 92: 453–470.
- Prance G.T. 1996. Islands in Amazonia. *Philosophical Transactions: Biological Sciences. The Royal Society*, 351(1341): 823-833.
- Proctor, M.C.F. 1978. Insect pollination syndromes in an evolutionary and ecosystemic context. In: Richards, A. J. (Ed.). *The pollination of flowers by insects*. Academic Press, London. p. 105-116.
- Ramirez, N. 2003. Floral specialization and pollination: a quantitative analysis and comparison of the Leppik and Faegri and van der Pijl classification systems. *Taxon*, 52: 687-700.
- Richards, A.J. 1997. Plant breeding systems. Chapman & Hall, Londres. 307pp.
- Rieseberg, L.H. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematic*., 28: 359–8.
- Rieseberg, L.H.; Carney, S.E. 1998. Tansley Review No. 1002 – Plant hybridization. *New Phytology*, 140: 599-624.
- Rieseberg, L.H.; Willis, J. H. 2007. Plant Speciation. *Science*, 317: 910-914.
- Rieseberg, L.H.; Wood, T.E.; Baack, E.J. 2006. The nature of plant species. *Nature*, 440 (23): 524-527.
- Robbrecht, E. 1988. Tropical woody Rubiaceae. *Opera Botanica Belgica*, 1: 1-271.
- Sagarin, R.D.; Gaines, S. D. 2002. The ‘abundant centre’ distribution: to what extent is it a biogeographical rule? *Ecology Letters*, 5: 137–147.
- Sakai, S.; Wright, J. 2008. Reproductive ecology of 21 coexisting *Psychotria* species (Rubiaceae): when is heterostyly lost? *Biological Journal of the Linnean Society*, 93: 125-134.

- Salomão, A.N.; Allem, A.C. 2001. Polyembryony in angiospermous trees of the Brazilian Cerrado and Caatinga vegetation. *Acta Botanica Brasilica*, 15: 369-378.
- Sang, T.; Zhong, Y. 2000. Testing Hybridization Hypotheses Based on Incongruent Gene Trees. *Systematic Biology*, 49 (3):422-434.
- Schemske, D.W.; Horvitz, C.C. 1984. Variation among floral visitors in pollination ability: a precondition for mutualism specialization. *Science*, 225: 519-521.
- Schumann, K. M. 1889. Rubiaceae. In: Martius, C. F. P.; Eichler, A. W. e Urban, I. *Flora Brasiliensis*. Vol. 6. Monachii et Lipsiae. 466pp.
- Sharbel, T.F.; Voigt, M.-L.; Corral, J.M.; Thiel, T.; Varshney, A.; Kumlehn, J.; Vogel, H.; Rotter, B. 2009. Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex. *The Plant Journal*, 58: 870-882.
- Solbrig, O. T. 1979. A cost-benefit analysis of recombination in plants. In: O. T. Solbrig, S. Jain, G. B. Johnson & P. H. Raven (Eds.), *Topics in plant population biology*. Columbia University Press, New York. Pp. 114-130
- Souza, V.C.; Lorenzi, H. 2008. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII*. Instituto Plantarum, Nova Odessa, Brasil. 640pp.
- Stearns, F.; Lieth, H. 1974. Methods for Phenological Studies. In: LIETH, H. (Ed.). *Phenology and Seasonality Modeling*. Springer Verlag, New York. p. 23-43.
- Steyermark, J.A. 1974. Rubiaceae. In: Lasser, T.; Steyermark, J. A. *Flora de Venezuela*. Vol. 9. Instituto Botánico, Caracas. p. 1-2070
- Stinchcombe, J.R.; Dorn, L.A.; Schmitt, J. 2004. Flowering time plasticity in *Arabidopsis thaliana*: a reanalysis of Westerman & Lawrence (1970). *Journal of Evolutionary Biology*, 17: 197-207.
- Sultan, S.E. 2001. Phenotypic plasticity for fitness components in *Polygonum* species of contrasting ecological breadth. *Ecology*, 82: 328-343.
- Takahasi, A. 1998. *Fenologia de espécies arbóreas de uma floresta atlântica no Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Ubatuba, SP*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 157pp.

- Tannus, J.L.S.; Assis, M.A.; Morellato, L.P.C. 2006. Fenologia reprodutiva em campo sujo e campo úmido numa área de cerrado no sudeste do Brasil, Itirapina – SP. *Biota Neotropica*, 6 (3): 1-27.
- Vicentini, A. 2004. A Vegetação ao Longo de um Gradiente Edáfico no Parque Nacional do Jaú. In: S. H. Borges; S. Iwanaga; C. C. Durigan; M. R., Pinheiro (Eds.). *Janelas para a biodiversidade no Parque Nacional do Jaú: uma estratégia para o estudo da biodiversidade na Amazônia*. Fundação Vitória Amazônica (FVA), WWF, IBAMA. Manaus. p. 117-143.
- Vogel, S. 1954. Blütenbiologische Typen als Elemente der Sippengliederung, dargestellt anhand der Flora Südafrikas. *Botanische Studien*, 1: 1-338.
- Waser, N.M.; Chittka, L.; Price, M.V.; Willians, N.M.; Ollerton J. 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, 77: 1043-1060.
- Washitani, I.; Osawa, R.; Namai, H.; Niwa, M. 1994. Patterns of female fertility in heterostylous *Primula sieboldii* under severe pollinator limitation, *Journal of Ecology*, 82: 571-579.
- Wendt, T.; Canela, M.B.F.; Klein, D.E.; RIOS, R.I. 2002. Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliacee). *Plant Systematics and Evolution*, 232: 201-202.
- Widmer, A.; Lexer, C.; Cozzolino, S. 2009. Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity*, 102: 31–38.
- Wilbert, S.M.; Schemsket, D.W.; Bradshaw, J.R.H.D. 1997. Floral Anthocyanins from Two Monkeyflower Species with Different Pollinators 1997. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25 (5): 437-443.
- Wilken, D.H. 1977. Local differentiation for phenotypic plasticity in the annual *Collomia linearis* (Polemoniaceae). *Systematic Botany*, 2: 99–108.
- Williams, J.L.; Auge, H.; Maron, J.L. 2008. Different gardens, different results: native and introduced populations exhibit contrasting phenotypes across common gardens. *Oecologia*, 157: 239–248.
- Wolfe, L.M.; Mazer, S.J. 2005. Patterns of phenotypic plasticity and their fitness consequences in wild radish (*Raphanus sativus*: Brassicaceae). *International Journal of Plant Science*, 166: 631–640.

Yeo, P.F. 1993. *Secondary pollen presentation. Form, function and evolution*. Springer-Verlag Berlin. 276pp.

Zirkle, C. 1935. *The beginnings of plant hybridization*. University of Pennsylvania Press, Philadelphia, PA, USA. 156pp.

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](#)