

**LUCIANA ALMEIDA GOMES TEIXEIRA**

**BIOLOGIA DA POLINIZAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE  
RUBIACEAE EM UM REMANESCENTE DE MATA ATLÂNTICA DE  
PERNAMBUCO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

RECIFE - PE

2001

**LUCIANA ALMEIDA GOMES TEIXEIRA**

**BIOLOGIA DA POLINIZAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE  
RUBIACEAE EM UM REMANESCENTE DE MATA ATLÂNTICA DE  
PERNAMBUCO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabel Cristina Sobreira Machado

RECIFE - PE

2001

Recife, 23 de Março de 2001.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabel Cristina S. Machado (Orientadora)

Prof. Dr. Paulo Eugênio Oliveira - UFU

Prof. Dr. Clemens Schilndwein - UFPE

SUPLENTES:

Prof. Dr. Celso Martins - UFPB

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gladys Flávia de Albuquerque Melo de Pinna - UFPE.

## AGRADECIMENTOS

Com mais uma etapa da minha vida concluída, gostaria de agradecer a todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram com o apoio, companheirismo, ensinamentos e em especial,

À Professora Isabel Cristina Machado por mais essa oportunidade de me ensinar a amar a biologia floral e, cada vez mais, estimular a descobrir e entender os mecanismos desta ciência. Obrigada pela confiança, amizade, paciência e por mostrar, sempre, com o próprio exemplo, o caminho do bom profissionalismo.

Aos meus pais, Jano e Ana Lúcia, ao meu avô Flávio e aos meus irmãos, Flaviano, Igor e Janaina pelo amor, paciência, apoio e, acima de tudo, pelos ensinamentos diários.

A Oscar Teixeira Basto Júnior pelo companheirismo, pelos incentivos constantes, ajuda nos trabalhos de campo, paciência e pelo amor.

À bióloga Ariadna Valentina de Freitas e Lopes pela amizade sincera, por todos os momentos de convivência e, principalmente, pela enorme ajuda em importantes fases deste trabalho, muito obrigada.

À Professora Kátia Pôrto pelo apoio e incentivo constante e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pela agradável convivência do dia a dia. À Giovanna Guterres e Hildebrando Silva pela convivência agradável, carinho e dedicação.

À Dra. Daniela Zappi pela análise e gentileza na identificação das espécies de Rubiaceae.

As amigas Evelise Locatelli, Shirley Rangel e Cleci Neves pela amizade, companheirismo e incentivo nas horas difíceis. À Isa Regina Leite e Ana Virgínia Leite pela ajuda nos trabalhos de campo e laboratório e, principalmente, pela amizade construída. Aos amigos Flávia Lins e Augusto Santiago pela amizade e incentivos.

A André Santos que, com paciência, ajudou na análise estatística dos resultados deste trabalho, muito obrigada. À Ana Emília e Reginaldo pela ajuda na utilização do microscópio de fluorescência do laboratório de Citogenética Vegetal.

As meninas do laboratório, Elisângela, Isadora, Ana Paula, Tarcila e Mirtes pela agradável convivência.

Aos companheiros de curso, Petrócio, Sílvia, Daniela, Adriana, Mary, Raquel, George, José Alves, Valdeline e Ulysses pela agradável convivência do dia a dia.

Ao povo brasileiro que, através do CNPq, financiou grande parte deste trabalho.

A Deus por ter construído coisas tão lindas, como as plantas e os animais e por ter me dado a oportunidade de estudá-las.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>04</b>
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>10</b>
<b>4. MANUSCRITO 1</b>	
- <b>Biologia da polinização e sistema reprodutivo de <i>Psychotria barbiflora</i></b>	
<b>DC (Rubiaceae).</b>	<b>14</b>
- <b>Resumo</b>	<b>14</b>
- <b>Abstract</b>	<b>15</b>
- <b>Introdução</b>	<b>16</b>
- <b>Material e métodos</b>	<b>17</b>
- <b>Resultados</b>	<b>18</b>
- <b>Discussão</b>	<b>21</b>
- <b>Referências Bibliográficas</b>	<b>26</b>
- <b>Legendas das figuras</b>	<b>28</b>
- <b>Figuras</b>	<b>29</b>
- <b>Tabelas</b>	<b>33</b>
<b>5. MANUSCRITO 2</b>	
- <b><i>Sabicea cinerea</i> Aubl. (Rubiaceae), distília e polinização em um fragmento de Floresta Atlântica em Pernambuco, Nordeste do Brasil.</b>	<b>36</b>
- <b>Abstract</b>	<b>37</b>
- <b>Resumo</b>	<b>38</b>
- <b>Introdução</b>	<b>39</b>
- <b>Material e métodos</b>	<b>40</b>
- <b>Resultados</b>	<b>42</b>
- <b>Discussão</b>	<b>46</b>
- <b>Referências Bibliográficas</b>	<b>53</b>
- <b>Legendas das figuras</b>	<b>57</b>
- <b>Figuras</b>	<b>59</b>
- <b>Tabelas</b>	<b>65</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>68</b>
<b>7. RESUMO GERAL</b>	<b>69</b>
<b>8. ABSTRACT</b>	<b>70</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>71</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As Angiospermas possuem flores com grande diversidade no tamanho, forma e cor, sendo essa variedade de características, responsáveis pela atração dos animais visitantes (Faegri & Pijl 1979; Dafni 1992; Endress 1994; Proctor *et al.* 1996) e estes, por sua vez, apresentam adaptações morfológicas e comportamentais que os tornam aptos a explorar os recursos oferecidos pelas flores e, conseqüentemente, promover a polinização (Proctor *et al.* 1996).

Funcionalmente, a flor é um órgão em que todas as suas complexas estruturas estão adaptadas para a reprodução sexuada e cada parte tem um papel especial na produção e dispersão de sementes (Faegri & Pijl 1979; Dafni 1992; Endress 1994). Os conhecimentos da estrutura floral e da fenologia da floração são pré-requisitos básicos para o entendimento do ciclo de vida da flor, bem como necessários para os estudos da polinização (Dafni 1992).

Vários estudos sobre biologia floral, sistemas de reprodução e mecanismos de polinização têm sido desenvolvidos nos últimos tempos, os quais são de grande importância para o entendimento do sucesso adaptativo, da dinâmica do fluxo gênico, da variabilidade genética das populações e dos mecanismos de especiação existentes nas espécies vegetais de qualquer ecossistema (Bawa *et al.* 1985; Faegri & Pijl 1979).

Segundo Ganders (1979), as plantas heterostílicas são as únicas, entre as auto-incompatíveis, em que seu grupo compatível pode ser determinado morfológicamente, sendo a heterostília um bom exemplo de evolução convergente em morfologia floral, genética e fisiologia, envolvendo adaptações a pressões seletivas em várias famílias de plantas. Além disso, estes sistemas heterostílicos são interessantes para estudos relacionados à ecologia, evolução e biologia da polinização em diversas populações vegetais.

O termo heterostilia foi utilizado pela primeira vez por Hildebrand (1867 *apud* Vuilleumier 1967), para descrever o mecanismo reprodutivo de plantas que, na mesma espécie, apresentavam duas ou três formas de flores, com diferenças entre si no comprimento do estilete e filete. Dez anos depois, Darwin (1877 *apud* Ganders 1979) utilizou os termos longistilia para as flores cujo comprimento do estilete ultrapassava o nível superior das anteras e brevistilia para as flores em que o estilete localizava-se em um nível abaixo da altura das anteras e, ainda, demonstrou que apenas a partir dos cruzamentos legítimos, intermorfos, ocorria a maior produção de sementes viáveis, quando comparado com os resultados dos cruzamentos ilegítimos, intramorfos.

A heterostilia é um polimorfismo controlado geneticamente, sendo formados dois ou três tipos de flores, caracterizados pela diferença recíproca no comprimento de estiletos e estames

(hercogamia recíproca), sendo mais comum à ocorrência da distília, com duas formas correspondentes, e mais raro a tristília, com três formas florais correspondentes na mesma espécie (Vuilleumier 1967; Ganders 1979; Barrett & Richards 1990; Barrett 1992; Dafni 1992; Kohn & Barrett 1992).

As espécies heterostílicas possuem um sistema de incompatibilidade heteromórfico, em que os cruzamentos viáveis, com formação de frutos e sementes, ocorrem somente entre estigmas de uma forma floral e anteras do nível equivalente, encontradas na outra forma (Dulberger 1992; Kohn & Barrett 1992). Este polimorfismo floral é considerado um importante mecanismo que impede a autopolinização, reduzindo os efeitos deletérios da autogamia dentro das populações vegetais, e promove a polinização cruzada, sendo os grãos de pólen transportados, por animais, em duas superfícies distintas do corpo, que correspondem a posições recíprocas dos estigmas nas formas florais, resultando no cruzamento legítimo (Beach & Bawa 1980; Barrett & Richards 1990; Lloyd & Webb 1992). As espécies heterostílicas, pela ação de um supergene, possuem uma reação de incompatibilidade que é determinada esporofiticamente e um sistema de incompatibilidade dialélico que, associado ao polimorfismo floral, previne ou reduz a autopolinização e a polinização intramorfos (Vuilleumier 1967; Barrett & Richards 1990; Dulberger 1992).

Além do posicionamento equivalente entre anteras e estigmas, as espécies heterostílicas possuem diferenças morfológicas, entre as formas brevistilas e longistilas, que estão diretamente associadas ao polimorfismo controlado por genes. Estas diferenças envolvem o tamanho e a forma das papilas estigmáticas, a cor, o tamanho, a escultura da exina e o número de grãos de pólen e, além disso, podem ocorrer diferenças no tamanho e na forma da corola (Ganders 1979; Barrett & Richards 1990; Dulberger 1992). As flores brevistilas, de um modo geral, apresentam papilas estigmáticas menores que as papilas das flores longistilas, entretanto, os grãos de pólen e o comprimento das anteras são maiores, apesar do número dos grãos produzidos ser menor e, além disso, a corola pode ser maior, em alguns poucos casos (Vuilleumier 1967; Ganders 1979; Barrett & Richards 1990; Dulberger 1992).

A heterostília é encontrada em cerca de 25 famílias de angiospermas, sendo a família Rubiaceae a que possui mais gêneros com este polimorfismo (Vuilleumier 1967; Andersson 1973; Ganders 1979; Barrett 1992; Kohn & Barrett 1992). De acordo com Bahadur (1968 *apud* Jung-Mendaçolli & Melhem 1995), a família possui, aproximadamente, 416 espécies heterostílicas, distribuídas em 31 gêneros, sendo a tribo Psychotrieae a que apresenta o maior número, cerca de 122 espécies.

A família Rubiaceae compreende cerca de 10.400 espécies com hábitos bastante variados, incluindo árvores, arbustos, lianas e poucas espécies herbáceas, epífitas e raramente aquáticas, encontradas em todo o mundo, principalmente nos trópicos, sendo distribuídas em 550 gêneros,



incluindo *Psychotria* e *Sabicea* com 1.400 e 120 espécies, respectivamente (Mabberley 1993). A família possui gêneros bastante conhecidos e economicamente importantes, como *Coffea*, pela utilização das sementes na fabricação de uma bebida estimulante, rica em cafeína e mundialmente conhecida, *Cinchona*, rica em quinino, droga muito usada no tratamento da malária, e *Psychotria*, de onde é feita a extração de uma substância utilizada para a fabricação de drogas que induzem o vômito (Judd *et al.* 1999).

No Brasil, ocorrem cerca de 101 gêneros, aproximadamente 1.010 espécies, distribuídas em todos os estados do país, principalmente na região amazônica, com alguns poucos representantes mostrando-se endêmicos da Serra da Neblina, Amazônia Brasileira, Bahia, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Barroso 1991).

Considerando a importante representatividade de espécies heterostílicas na família Rubiaceae e ressaltando este interessante mecanismo reprodutivo que envolve a hercogamia recíproca, este trabalho visa analisar o sistema reprodutivo, a biologia floral e a polinização de *Psychotria barbiflora* DC. e *Sabicea cinerea* Aubl., espécies simpátricas em um importante remanescente de Mata Atlântica na região metropolitana do Recife.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### Estudos relacionados a heterostilia, polinização e sistema reprodutivo de espécies de Rubiaceae.

Um dos primeiros trabalhos a abordar a origem e o desenvolvimento evolutivo da heterostilia nas Angiospermas foi o de Vuilleumier (1967), que além de apresentar um levantamento detalhado dos gêneros heterostílicos, citando *Psychotria* e *Sabicea*, discute o grau de incompatibilidade fisiológica e a ocorrência de dimorfismo morfológico. Além disso, o autor discute as bases genéticas e fisiológicas da heterostilia, sugerindo que esta tenha evoluído independente e convergentemente em diversas taxa das Angiospermas.

Posteriormente, em um trabalho de revisão, Bahadur (1968 *apud* Jung-Mendaçolli & Melhem 1995) verificou a existência de 416 espécies heterostílicas de Rubiaceae, distribuídas em 31 gêneros. O autor mencionou, ainda, que o maior número de espécies heterostílicas, cerca de 122, ocorria na tribo Psychotrieae.

Um dos primeiros autores a abordar a origem da heterostilia na família Rubiaceae, baseado em hipóteses relacionadas à morfologia floral, foi Andersson (1973). O autor propõe que a heterostilia tenha surgido, na família, a partir de espécies protândricas e auto-compatíveis. Comenta que, após uma mutação nas plantas protândricas, surgindo um alelo dominante em que produziu flores GG e Gg auto-compatíveis, o estágio de alongamento do estilete, em fase posterior à antese, foi eliminado, promovendo a maturação do estigma em uma porção dentro do tubo da corola. O autor sugere, ainda, que o alelo mutante tenha sofrido um processo de seleção, surgindo flores recessivas gg, dando origem às plantas longistílicas e alógamas.

Ornduff (1974), ao estudar heterostilia em plantas da África do Sul, verificou a ocorrência de espécies heterostílicas como *Oldenlandia rupicola*, *O. muscosa* e *O. affinis*, homostílicas como *O. corymbosa*, *O. capensis* e *O. caespitosa* e as espécies *O. rosulata* e *O. herbacea* apresentando variedades tanto heterostílicas como homostílicas.

No mesmo ano, Ganders (1975) encontrou populações distílicas e homostílicas de *Mitchella repens*, na América do Norte, e, ao estudar o sistema reprodutivo, verificou a ocorrência de auto-incompatibilidade intramorfos, inclusive nas plantas homostílicas, cujas flores são funcionalmente brevistilas.

Em 1979, o mesmo autor publicou um trabalho sobre a biologia da heterostilia, fazendo uma revisão para os gêneros heterostílicos, distribuídos em 24 famílias de Angiospermas, citando

*Psychotria* e *Sabicea*. O autor refere-se, ainda, aos aspectos morfológicos florais, sistema reprodutivo, evolução e quebra da heterostilia.

No mesmo ano, Keegan *et al.* (1979), ao estudarem populações heterostílicas também de *Mitchella repens*, na América do Norte, confirmaram a ocorrência de auto-incompatibilidade controlada esporofiticamente, com a barreira ao crescimento dos tubos polínicos localizada no tecido estigmático.

Ainda em 1979, Wyatt & Hellwig, estudando populações heterostílicas de *Houstonia caerulea*, demonstraram que em subpopulações heterogêneas, compostas de indivíduos brevistílicos e longistílicos próximos entre si, a formação de frutos foi maior, quando comparado com subpopulações homogêneas, formadas, apenas, por indivíduos do mesmo tipo floral. Os autores verificaram que houve uma diminuição na taxa de formação de frutos proporcionalmente ao aumento das subpopulações homogêneas e da distância entre as formas compatíveis.

Em 1980, Beach & Bawa publicaram um trabalho sobre o papel dos polinizadores na evolução da distília para a dioícia, discutindo essa evolução como sendo o resultado da quebra do fluxo complementar de pólen entre as formas distílicas, comentando mudanças na biologia da polinização em *Coussarea talamancana* e em espécies de *Psychotria* e *Houstonia*.

Posteriormente, os mesmos autores Bawa & Beach (1983), estudaram os sistemas de auto-incompatibilidade de 10 espécies distílicas dos gêneros *Cephaelis*, *Coussarea*, *Faramea*, *Psychotria*, *Rudgea* e quatro espécies homostílicas dos gêneros *Hamelia*, *Posoqueria* e *Warszewiczia*. Os autores observaram que das 10 espécies distílicas, nove foram auto-incompatíveis, sendo o estigma, o local da inibição dos tubos polínicos em flores brevistilas autopolinizadas e nas polinizações intramorfos. Entretanto, em flores longistilas, o local da inibição mostrou-se variável. As espécies homostílicas, segundo os autores, foram auto-incompatíveis.

No mesmo ano, estudando a biologia reprodutiva de *Palicourea fendleri* e *P. petiolaris* na Venezuela, Sobrevila *et al.* (1983) verificaram a ocorrência de auto-compatibilidade, principalmente nas formas longistilas, em algumas populações. Observaram, também, que nas duas espécies havia um maior número de flores longistilas quando comparado com o número total de flores brevistilas.

A biologia reprodutiva de duas populações distílicas, da América do Norte, de *Mitchella repens* foi novamente estudada, desta vez, por Hicks *et al.*, em 1985. Os autores verificaram que a formação de frutos em condições naturais foi de 86%, nos dois morfos, e não aumentava com os experimentos de polinização manual, entretanto, observaram que, nas duas populações, a produção de sementes proveniente dos cruzamentos intramorfos era menor quando comparado com os cruzamentos intermorfos. Várias espécies nativas de abelhas do gênero *Bombus* foram observadas visitando as flores, sendo responsáveis pelos altos índices de produção de sementes.

Feinsinger & Busby (1987), ao estudarem o transporte de pólen entre os morfos de *Palicourea lasiorrachis* na Costa Rica, observaram a polinização pelo beija-flor *Lampornis calolaema* e que, apenas, através dos cruzamentos intermorfos havia a produção de frutos e sementes. Os autores verificaram que, paralelamente a floração de *P. lasiorrachis*, havia outra espécie de Rubiaceae, *Cephaelis elata*, também visitada pelo mesmo beija-flor, havendo a sobreposição de carga polínica das duas espécies, afetando, principalmente, o transporte de pólen e a formação de frutos entre flores brevistilas e longistilas de *P. lasiorrachis*. No ano seguinte, Feinsinger *et al.* (1988), estudando as mesmas espécies na Costa Rica, verificaram, através da contagem dos tubos polínicos nos estiletos das flores de *P. lasiorrachis*, que o fluxo de pólen entre os morfos florais sofreu interferência dos grãos de pólen de *C. elata* e, conseqüentemente, diminuindo a formação de frutos e sementes, afetando o sucesso reprodutivo de *P. lasiorrachis*.

Posteriormente, Barrett & Richards (1990), revisando a heterostilia em plantas tropicais, indicaram uma variedade de modificações evolutivas na síndrome, entre elas a substituição da distilia em vários gêneros de Rubiaceae e a quebra da polinização cruzada para autopolinização associada a homostilia.

No mesmo ano, Gibbs (1990) fez um estudo sobre auto-incompatibilidade em espécies de angiospermas neotropicais, mencionando o sistema de auto-incompatibilidade heteromórfico para várias espécies de Rubiaceae,

Em um estudo de revisão de *Psychotria* subgênero *Psychotria*, Hamilton (1990), observou, através de material herborizado, que o grupo apresenta um grande número de espécies heterostílicas. Em trabalhos de campo, observou que *P. marginata* era polinizada apenas por abelhas de língua curta, enquanto que *P. horizontalis* era polinizada por uma grande diversidade de lepidópteros e himenópteros.

Ainda em 1990, Murray, estudando a biologia floral de *Luculia gratissima*, observou, além do dimorfismo floral, um sistema reprodutivo auto-incompatível. Através de testes, o autor constatou que os tubos polínicos incompatíveis tiveram os sítios de inibição localizados na base do estigma, nos dois morfos florais, 24 horas após as polinizações. Posteriormente, foram feitos testes de polinizações manuais com grãos de pólen compatíveis e incompatíveis e os resultados mostraram que os tubos incompatíveis não interferiam no crescimento dos tubos compatíveis.

Em seguida, Monteiro *et al.* (1991) ao estudarem a morfologia e distribuição espacial das formas heterostílicas de *Psychotria barbiflora* DC, verificaram que as plantas longistílicas produziram mais frutos que as plantas brevistílicas, indicando possíveis funções maternal e paternal, respectivamente.

No ano seguinte, Barrett (1992) publicou um livro abordando trabalhos relacionados com a evolução e função da heterostilia, citando várias espécies de Rubiaceae, principalmente do gênero *Psychotria*.

O sistema reprodutivo e a estrutura genética de *Psychotria faxlucens* foram investigados por Pérez-Nasser *et al.* em 1993, na costa do Golfo do México. Os autores verificaram a ocorrência de distilia e a polinização das flores por mariposas, além de auto-incompatibilidade e uma alta razão pólen-óvulo, sugerindo xenogamia obrigatória.

No mesmo ano, Richards & Koptur (1993), estudando a variação floral e a distilia em *Guettarda scabra* no sul da Flórida, observaram que a largura do estigma foi variável entre os morfos, entretanto o comprimento das anteras e das papilas estigmáticas e o diâmetro dos grãos de pólen foram semelhantes. Em relação ao sistema reprodutivo, os autores verificaram auto-compatibilidade e a possível ocorrência de autopolinização.

Jung-Mendaçolli & Melhem (1995) estudaram os grãos de pólen de 25 espécies heterostílicas de Rubiaceae, distribuídos em nove gêneros, *Coccocypselum*, *Coussarea*, *Declieuxia*, *Faramea*, *Hedyotis*, *Manettia*, *Palicourea*, *Psychotria* e *Rudgea*. As autoras verificaram que, de uma forma geral, a família caracteriza-se por apresentar grãos de pólen euripolínicos, com escultura mais consistente e visível nas flores brevistilas do que nas longistilas. Observaram ainda, que as espécies de *Psychotria* possuem grãos estenopolínicos, esféricos e do tipo inaperturado, sendo maiores nas flores brevistilas.

Passos & Sazima (1995), estudando a biologia reprodutiva de *Manettia luteo-rubra*, verificaram a hercogamia recíproca com plantas morfologicamente distílicas, ocorrendo na razão de 1:1, e diferenças no diâmetro do pólen e no comprimento da corola entre flores brevistilas e longistilas. Relataram ainda um sistema de auto-incompatibilidade intramorfos e, além disso, observaram três espécies de beija-flores, *Phaethornis eurynome*, *P. squalidus* e *Thalurania glaucopis*, e três espécies de borboletas do gênero *Heliconius* visitando as flores.

No mesmo ano, Riveros *et al.* (1995) relataram auto-compatibilidade nos dois morfos de *Hedyotis salzmannii*, verificando que houve a formação de frutos por autopolinização manual e autopolinização espontânea nos dois morfos florais, entretanto no teste de apomixia, a formação de frutos foi observada apenas nas flores longistilas. Por fim, comentam que foram observadas duas espécies de abelhas, uma Apidae e uma Halictidae, e duas espécies de Syrphidae como polinizadores.

Ainda em 1995, Stone, ao estudar o padrão de doação de pólen em *Psychotria suerrensis*, analisou a eficiência da distilia em promover a função masculina em um dos morfos florais, através da verificação da carga polínica nos estigmas. A autora constatou que, através de experimentos de emasculação das flores, os grãos de pólen das flores longistilas foram transferidos mais eficientemente para estigmas de flores brevistilas, enquanto que os grãos das flores brevistilas foram

dispersados de forma igual para flores de ambos os morfos, sugerindo, dessa forma, que a distília seja parcialmente efetiva na doação de pólen e que a função masculina, das flores longistilas de *P. suerrensis*, foi acentuada pelo polimorfismo, o que não ocorreu com as flores brevistilas. Entretanto, a autora, verificou que a formação de sementes, em ambos os morfos, foi igual, reduzindo a importância da função masculina.

A mesma autora em 1996, estudando os polinizadores de *Psychotria suerrensis*, observou visitas de abelhas, vespas, borboletas e beija-flores e, através de experimentos de captura, constatou que as espécies de abelhas transferiram significativamente mais pólen intermorfos, sendo espécies de euglossine os polinizadores mais eficientes.

Pailler & Thompson (1997), ao estudarem a distília e a auto-incompatibilidade heteromórfica em *Gaertnera vaginata*, observaram que as flores brevistilas apresentaram grãos de pólen e comprimento da corola maiores, enquanto que as flores longistilas produziram mais grãos por flor. Através de polinizações controladas ilegítimas, os autores verificaram a formação de frutos em flores brevistilas e, praticamente, a mesma porcentagem de frutos formados em polinizações legítimas nos dois morfos. Por fim, comentam que em 16, das 19 populações estudadas, o número de plantas brevistílicas foi maior que as longistílicas.

Estudando o sistema reprodutivo de *Nesohedyotis arborea*, Percy & Cronk (1997), relataram a ocorrência de dioícia, apresentando flores funcionalmente femininas com anteras vestigiais, longo estilete e papilas estigmáticas lisas, e flores funcionalmente masculinas com estilete curto, papilas estigmáticas rugosas e produzindo poucas sementes, sugerindo uma condição ancestral heterostílica para a espécie. Os autores observaram, ainda, a polinização das flores por moscas.

No mesmo ano, Grandisoli (1997) estudou a biologia floral e reprodutiva de *Psychotria suterella*, a qual oferece néctar aos seus visitantes e tendo *Bombus morio* como seu principal polinizador. O autor verificou a ocorrência de heterostília do tipo distílica e auto-incompatibilidade reprodutiva com formação de frutos, preferencialmente, nos cruzamentos intermorfos.

Ainda em 1997, Ree estudou o fluxo de pólen, a fecundidade e a heterostília de *Palicourea padifolia*, observando que as flores distílicas foram visitadas por beija-flores e abelhas e que, além disso, a formação de frutos foi possível apenas através de cruzamentos intermorfos. O autor verificou que as flores longistilas produziram mais sementes que as flores brevistilas, sugerindo uma alta deposição de pólen compatível na superfície estigmática e a possível alocação de recursos para posteriores funções femininas e masculinas, respectivamente, das flores.

Recentemente, Machado & Loiola (2000) estudaram a polinização por moscas e a partilha de polinizadores em duas espécies sincronopátricas de *Cordia multispicata* (Boraginaceae) e *Borreria alata* (Rubiaceae) no Parque Estadual de Dois Irmãos, em Pernambuco, Nordeste do Brasil. As autoras observaram que *B. alata* produziu flores durante todo o ano, com picos entre os meses de

maio e julho (estação chuvosa) e de outubro a dezembro (estação seca). A espécie de Rubiaceae possui flores distílicas, brancas, tubulosas, apresentando variações no comprimento dos estiletos, com tamanhos intermediários em flores de uma mesma inflorescência. A produção de frutos em condições naturais foi de 78%, sendo as flores visitadas por seis espécies de moscas, principalmente do gênero *Palpada*, as quais foram consideradas como os polinizadores mais importantes, e abelhas *Apis melifera*, *Trigona spinipes* e *Augochloropsis* sp., considerados como polinizadores ocasionais.

No mesmo ano, Ortiz *et al.* (2000), estudando a polinização e o sistema reprodutivo de *Putoria calabrica*, observaram a ocorrência de protandria, cujas flores, na fase masculina, apresentam os lobos da corola estendidos, enquanto que na fase feminina, os lobos encurvam-se diminuindo a abertura do tubo da corola, com o estilete projetando-se acima dos estames. A produção de néctar, em ambas as fases, foi similar, sendo as flores polinizadas por espécies de dípteros e lepidópteros. Os autores observaram que as flores duram de 3 a 5 dias, sendo a espécie auto-compatível.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersson, W. R. 1973. A morphological hypothesis for the origin of heterostyly in the Rubiaceae. **Taxon** **22**: 537-542.
- Barrett, S. C. H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: Barrett, S. C. H. (ed.). **Evolution and function of heterostyly**. pp. 1-24. Monographs on Theoretical and Applied Genetics. Springer-Verlag, Berlin. 279p.
- Barrett, S. C. H. & Richards, J. H. 1990. Heterostyly in tropical plants. **Memoirs of the New York Botanical Garden** **55**: 35-61.
- Barroso, G. M. 1991. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Vol. 3. Universidade Federal de Viçosa. 326p.
- Bawa, K. S. & Beach, J. H. 1983. Self-incompatibility systems in the Rubiaceae of a tropical lowland wet forest. **American Journal of Botany** **70**: 1281-1288.
- Bawa, K. S.; Perry, D. R. & Beach, J. H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. **American Journal of Botany** **72**: 346-356.
- Beach, J. H. & Bawa, K. S. 1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distyly. **Evolution** **34**: 1138-1142.
- Dafni, A. 1992. **Pollination Ecology**. The practical approach series. Oxford University Press, Oxford. 250p.
- Dulberger, R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In: S.C.H. Barrett (ed.) **Evolution and function of heterostyly**. pp. 41-84. Monographs on Theoretical and Applied Genetics. Springer-Verlag, Berlin. 279p.
- Endress, P. K. 1994. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge University Press, Cambridge. 511p.
- Faegri, K. & Pijl, L. 1979. **The principles of pollination ecology**. London, Pergamon Press. 244p.
- Feinsinger, P. & Busby, W. H. 1987. Pollen carryover: experimental comparisons between morphs of *Palicourea lasiorrachis* (Rubiaceae), a distylous, bird-pollinated, tropical treelet. **Oecologia** **73**: 231-235.
- Feinsinger, P.; Busby, W. H. & Tiebout III, H. M. 1988. Effects of indiscriminate foraging by tropical hummingbirds on pollination and plant reproductive success: experiments with two tropical treelets (Rubiaceae). **Oecologia** **76**: 471-474.
- Ganders, F. R. 1975. Fecundity in distylous and self-incompatible homostylous plants of *Mitchella repens* (Rubiaceae). **Evolution** **29**: 186-188.
- Ganders, F. R. 1979. The biology of heterostyly. **New Zealand Journal of Botany** **17**: 607-635.



- Gibbs, P. 1990. Self-incompatibility in flowering plants: a neotropical perspective. **Revista brasileira de Botânica** **13**: 125-136.
- Grandisoli, E. A. C. 1997. **Biologia reprodutiva e estrutura da população de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) em um fragmento de mata secundária em São Paulo**. Universidade Estadual de São Paulo. São Paulo. Dissertação de Mestrado.
- Hamilton, C. W. 1990. Variations on a distylous theme in Mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). **Memoirs of the New York Botanical Garden** **55**: 62-75.
- Hicks, D. J.; Wyatt, R. & Meagher, T. R. 1985. Reproductive biology of distylous partridgeberry, *Mitchella repens*. **American Journal of Botany** **72**: 1503-1514.
- Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A. & Stevens, P. F. 1999. **Plant Systematics. A Phylogenetic Approach**. Sinauer, Sunderland. 464p.
- Jung-Mendaçolli, S. & Melhem, T. 1995. Grãos de pólen de espécies heterostílicas de Rubiaceae. **Revista brasileira de Botânica** **18**: 61-93.
- Keegan, C. R.; Voss, R. H. & Bawa, K. S. 1979. Heterostyly in *Mitchella repens* (Rubiaceae). **Rhodora** **81**: 567-573.
- Kohn, J. R. & Barrett, S. C. 1992. Experimental studies on the functional significance of heterostyly. **Evolution** **46**: 43-55.
- Lloyd, D. G. & Webb, C. J. 1992. The evolution of heterostyly. In: S.C.H. Barrett (ed.) **Evolution and function of heterostyly**. pp. 150-178. Monographs on Theoretical and Applied Genetics. Springer-Verlag, Berlin. 279p.
- Mabberley, D. J. 1993. **The Plant-Book. A portable dictionary of the higher plants**. Cambridge University Press. New York. 706p.
- Machado, I. C. & Loiola, I. 2000. Fly pollination and pollinator sharing in two synchronopatric species: *Cordia multispicata* (Boraginaceae) e *Borreria alata* (Rubiaceae). **Revista brasileira de Botânica** **23**: 305-311.
- Monteiro, R.; Nakajima, J. N.; Ribeiro, J. L. S. & Toledo, J. C. 1991. Morfologia e distribuição espacial das formas heterostílicas de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). **Naturalia** **16**: 137-146.
- Murray, B. G. 1990. Heterostyly and pollen-tube interactions in *Luculia gratissima* (Rubiaceae). **Annals of Botany** **65**: 691-698.
- Ornduff, R. 1974. Heterostyly in South African flowering plants: A conspectus. **Journal of South African Botany** **40**: 169-187.
- Ortiz, P. L.; Arista, M. & Talavera, S. 2000. Pollination and breeding system of *Putoria calabrica* (Rubiaceae), a Mediterranean dwarf shrub. **Plant Biology** **2**: 325-330.

- Pailler, T. & Thompson, J. D. 1997. Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (Rubiaceae) endemic to La Reunion Island. **American Journal of Botany** **84**: 315-327.
- Passos, L. & Sazima, M. 1995. Reproductive biology of the distylous *Manettia luteo-rubra* (Rubiaceae). **Botanica Acta** **108**: 309-313.
- Percy, D. M. & Cronk, Q. C. B. 1997. Conservation in relation to mating system in *Nesohedyotis arborea* (Rubiaceae), a rare endemic tree from St Helena. **Biological Conservation** **80**: 135-145.
- Pérez-Nasser, N.; Eguiarte, L. E. & Piñero, D. 1993. Mating system and genetic structure of the distylous tropical tree *Psychotria faxlucens* (Rubiaceae). **American Journal of Botany** **80**: 45-52.
- Proctor, M.; Yeo, P. & Lack, A. 1996. **The natural history of pollination**. Harper Collins Publishers, London. 479p.
- Ree, R. H. 1997. Pollen flow, fecundity, and the adaptive significance of heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). **Biotropica** **29**: 298-308.
- Richards, J. H. & Koptur, S. 1993. Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae). **American Journal of Botany** **80**: 31-40.
- Riveros, G. M.; Barria, O. R. & Humaña, A., 1995. Self-compatibility in distylous *Hedyotis salzmannii* (Rubiaceae). **Plant Systematics and Evolution** **194**: 1-8.
- Sobrevila, C.; Ramirez, N. & Enrech, N. X. 1983. Reproductive biology of *Palicourea fendleri* and *Palicourea petiolaris* (Rubiaceae), heterostyly shrubs of a Tropical Cloud Forest in Venezuela. **Biotropica** **15**: 161-169.
- Stone, J. L. 1995. Pollen donation patterns in a tropical distylous shrub (*Psychotria suerrensis*; Rubiaceae). **American Journal of Botany** **82**: 1390-1398.
- Stone, J. L. 1996. Components of pollination effectiveness in *Psychotria suerrensis*; a tropical distylous shrub. **Oecologia** **107**: 504-512.
- Vuilleumier, B. S. 1967. The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. **Evolution** **21**: 210-226.
- Wyatt, R. & Hellwig, R. L. 1979. Factors determining fruit set in heterostylous bluets, *Houstonia caerulea* (Rubiaceae). **Systematic Botany** **4**: 103-114.

**4. MANUSCRITO ENVIADO AO PERIÓDICO Acta Botanica Brasilica**

**BIOLOGIA DA POLINIZAÇÃO E SISTEMA REPRODUTIVO DE  
*PSYCHOTRIA BARBIFLORA* DC (RUBIACEAE).**

Luciana Almeida Gomes Teixeira<sup>1</sup>

Isabel Cristina Machado<sup>1</sup>

**RESUMO** – (Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC (Rubiaceae)). Os estudos da biologia floral e polinização de *Psychotria barbiflora* foram realizados no período de abril/1999 a setembro/2000, no Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife (PE), um remanescente de floresta Atlântica. *Psychotria barbiflora* é uma espécie subarbustiva (0,5-2,0 m de alt.), com período de floração entre abril e julho e frutificação de junho a setembro. A espécie apresenta heterostilia do tipo distílica, com flores em inflorescências terminais, pendentes, envoltas por brácteas, que apresentam coloração esverdeada durante a floração e tornam-se arroxeadas na fase de frutificação. A antese inicia por volta das 4:30h e as flores duram até 13:00h. O volume de néctar foi ca. 0,45 e 0,30µl e a concentração de açúcares, aproximadamente 22 e 24%, nas flores brevistilas e longistilas, respectivamente. Os morfos florais apresentaram semelhança em relação ao tamanho da corola, entretanto as flores brevistilas apresentaram grãos de pólen maiores e em menor quantidade quando comparado com as flores longistilas. *Psychotria barbiflora* é melitófila, sendo polinizada por três espécies de abelhas, as quais foram observadas coletando néctar e pólen, e por uma vespa, coletando apenas néctar, em ambos os morfos florais. Com base nos resultados dos testes de polinização manual e nas observações do crescimento do tubo polínico, pode-se concluir que esta espécie é auto-incompatível do tipo esporofítica, só havendo a formação de frutos nos cruzamentos intermorfos.

**Palavras chave** – Rubiaceae, *Psychotria*, heterostilia, melitofilia, polinização, reprodução.

**ABSTRACT** – (Pollination biology and reproductive system of *Psychotria barbiflora* DC (Rubiaceae)).

The investigation of the floral biology and the pollination of *Psychotria barbiflora* was carried out in the period from April/1999 to September/2000, in the Dois Irmãos State Park, Recife (PE), an Atlantic Forest remnant. *Psychotria barbiflora* is a subshrub species (0,5-2,0 m of alt.), with flowering period between April and July and fruiting period from June to September. The species presents heterostyly (distyly), with flowers in terminal, pendant inflorescences, wrapped up in bracts, which are greenish during flowering and become purple during the fruiting phase. The anthesis begins at about 4.30 a.m. and the flowers last up to 1.00 p.m.. The nectar volume was ca. 0,45 and 0,30µl and sugar concentration, approximately 22 and 24%, respectively in short and long-styled flowers. The floral morphs were similar in corola size but brevistylous flowers presented larger and less numerous pollen grains when compared to longistylous flowers. *Psychotria barbiflora* is mellitophilous, pollinated by three species of bees which were observed collecting nectar and pollen, and also by a wasp, which collects only nectar, in both floral morphs. Based on the results of hand-pollination tests and observations of pollen tubes growth, it can be concluded that this species is self-incompatible of the sporophytic type, with fruit-set only after intermorphs crossings.

**Key words** – Rubiaceae, *Psychotria*, heterostyly, melittophily, pollination, reproduction.

<sup>1</sup> Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, 50372-970, Recife-PE, Brasil. e-mail: lagt@npd.ufpe.br/imachado@npd.ufpe.br

## Introdução

A heterostilia é um polimorfismo floral controlado geneticamente, o qual apresenta duas expressões morfológicas, a distilia e a tristilia, caracterizadas morfológicamente pela diferença no comprimento de estiletos e filetes (hercogamia recíproca), diferenças no comprimento da corola, tamanho e produção de pólen e tamanho das papilas estigmáticas entre os morfos florais. Além disso, geralmente possui um sistema de incompatibilidade dialélico esporofítico, em que só há formação de frutos viáveis nos cruzamentos intermorfos (Vuillemier 1967; Ornduff 1974; Ganders 1979; Barrett & Richards 1990; Barrett 1992; Kohn & Barrett 1992).

A família Rubiaceae é caracterizada por possuir o maior número de espécies heterostílicas, quando comparada com as outras 24 famílias de Angiospermas. Bahadur (1968 *apud* Jung-Mendaçolli & Melhem 1995) relatou a ocorrência de heterostilia em 416 espécies da família, distribuídas em 31 gêneros, com a tribo Psychotrieae apresentando cerca de 122 espécies com o polimorfismo. A grande maioria das espécies de Rubiaceae é encontrada na região dos trópicos, com hábitos bastante variados, incluindo árvores, arbustos, lianas e poucas espécies herbáceas, epífitas e raramente aquáticas (Mabberley 1993).

Com relação ao gênero *Psychotria*, apesar do grande número de representantes, há poucos trabalhos relacionados com a heterostilia, biologia da polinização e reprodução. Dentre estes, podemos destacar o estudo sobre o sistema reprodutivo de espécies de Rubiaceae, na Costa Rica, incluindo quatro espécies de *Psychotria* (Bawa & Beach 1983), a heterostilia e o sistema reprodutivo de *P. leiocarpa* (Lima 1988), a variação da distilia em espécies de *Psychotria* (Hamilton 1990), a análise da morfologia e a distribuição espacial das formas heterostílicas de *P. barbiflora* em cerrado do estado de São Paulo (Monteiro *et al.* 1991), o sistema reprodutivo e a estrutura genética de *P. faxlucens* (Pérez-Nasser *et al.* 1993), a eficiência da polinização de *P. suerrensis* (Stone 1995, 1996) e a biologia floral, fenologia e polinização de *P. suterella* (Grandisoli 1997).

No presente trabalho são abordados a biologia floral, a polinização, o sistema reprodutivo e os aspectos relacionados a heterostilia de *Psychotria barbiflora*, em um importante fragmento de floresta Atlântica em área urbana de Pernambuco.

## Material e Métodos

Os estudos de campo foram desenvolvidos no Parque Estadual Dois Irmãos, um fragmento de Mata Atlântica localizado no município de Recife, estado de Pernambuco (8°7'30"S e 34°52'30"WG), durante o período de abril/1999 a setembro/2000, totalizando cerca de 200 horas de observações. O Parque possui extensão aproximada de 370 ha, distribuído em área de relevo levemente ondulado e altitude de 30 a 80m (Machado *et al.* 1998), fazendo parte da Floresta Estacional Perenifolia Costeira (Andrade-Lima 1961), também denominada de mata úmida por Vasconcelos-Sobrinho (1949) ou Floresta Atlântica por Rizzini (1979).

As observações de campo, em relação aos caracteres gerais das flores, como morfologia, cor, horário, duração e seqüência de antese, receptividade do estigma, número de flores abertas por inflorescência e a disponibilidade de néctar e pólen, foram feitas utilizando-se 20 indivíduos distribuídos em três trilhas no interior do Parque. Em laboratório, foram feitas análises com relação à viabilidade e a morfometria polínica, assim como ao número de grãos de pólen e óvulos por flor, em flores de 20 indivíduos, 10 brevistílicos e 10 longistílicos.

Foram feitos desenhos comparativos entre as flores longistilas e brevistilas, com auxílio de câmara clara acoplada a um microscópio estereoscópico, ressaltando as diferenças morfométricas florais como, tamanho da corola, altura das anteras e comprimento do estilete. A contagem do número de grãos de pólen e óvulos por flor foi feita com auxílio de microscópio estereoscópico, utilizando-se 10 botões, de cada morfo floral, em fase de pré-antese, e posteriormente feito o cálculo da razão pólen/óvulo (Cruden 1977). A viabilidade polínica foi testada através da técnica de coloração do citoplasma por carmim acético 1,2% (Radford *et al.* 1974), utilizando-se pólen de 10 botões, em fase de pré-antese, provenientes de cinco indivíduos brevistílicos e cinco longistílicos. As medidas de 25 grãos de pólen, dos dois morfos, foram feitas utilizando-se flores frescas, tendo sido comparados os resultados através de análise de variância. Todas as medidas, como o tamanho das flores, comprimento dos estames e estiletos, número e tamanho dos grãos de pólen, foram analisadas e comparadas estatisticamente pelo teste *U* (Mann-Whitney/Systat 6.0.1).

A concentração de açúcares e o volume do néctar foram medidos, respectivamente, às 8:00 e 12:00h do dia, com auxílio de refratômetro de bolso e micro-seringas, em flores brevistilas e longistilas ensacadas no dia anterior à antese. A receptividade do estigma foi determinada, em campo, através da reação com peróxido de hidrogênio (Zeisler 1938).

A fenologia da floração e da frutificação foi acompanhada semanalmente no campo, sendo registrados o período de emissão de botões, flores, frutos verdes e maduros em 20 indivíduos, 10 brevistílicos e 10 longistílicos. O padrão de floração da espécie foi descrito de acordo com as classificações de Gentry (1974) e Newstron *et al.* (1994).

O sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* foi estudado através de experimentos de autopolinização manual e polinização cruzada intermorfos, realizados no campo, de acordo com as indicações de Radford *et al.* (1974). Nos diferentes tratamentos, os botões em fase de pré-antese foram isolados, enquanto que o restante dos botões da inflorescência foi descartado. Toda a inflorescência foi encoberta com sacos de papel semi-permeável e o tipo de polinização desejada feita no dia seguinte, por ocasião da antese. O controle foi feito a partir da marcação de duas inflorescências de cada morfo floral, contados o número de botões e, posteriormente, o número de frutos e sementes formados.

Para a análise do crescimento do tubo polínico, foram feitas autopolinizações manuais e polinizações intra e intermorfos em laboratório, utilizando-se flores mantidas em caixas de acrílico (gerbox) com meio de ágar 2%, sendo posteriormente fixadas em FAA 70%, em intervalos de 8h, 12h, 24h e 48h, coradas e analisadas em microscópio de fluorescência (Martin 1959).

Foram realizadas observações, no campo, sobre frequência, duração e comportamento das abelhas e vespas visitantes, assim como o recurso floral procurado e o resultado das visitas (polinização ou pilhagem). O estudo do comportamento dos visitantes foi feito através de observações no campo em diferentes horários do dia, complementado através de registros fotográficos. A frequência de visitas das espécies foi determinada através de 35 horas de observação, durante cinco dias (6:00 às 13:00 horas), sendo registrado o número de visitas de cada animal por hora e classificados como muito e pouco freqüentes. Alguns visitantes foram coletados com auxílio de rede entomológica e posteriormente montados a seco para identificação. Os espécimes-testemunho encontram-se depositados na coleção do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva (Departamento de Botânica-UFPE). O material botânico foi coletado, herborizado e depositado como espécime-testemunho no herbário UFP (n<sup>os</sup> 27.894 e 27.896).

## Resultados

*Psychotria barbiflora* é uma espécie subarbustiva, com cerca de 0,5-2,0 m de altura, distribuída no sub-bosque da mata, principalmente em locais mais úmidos. A espécie é caracterizada por apresentar heterostilia do tipo distílica, com indivíduos brevistílicos e longistílicos ocorrendo na proporção de 1:1.

As inflorescências são terminais, pendentes, envoltas por brácteas com coloração esverdeada na floração e arroxeadas na fase de frutificação. Cada inflorescência apresenta 50 a 65 botões, em indivíduos brevistílicos, e 75 a 85 botões, nos longistílicos. As flores são brancas, actinomorfas, pentâmeras e a corola, gamopétala, forma um tubo, com muitos pêlos em toda face interna.



Apresenta média de 6,5 mm de compr. nas flores brevistilas (n=10) e 6,8 mm de compr. nas flores longistilas (n=10), não apresentando diferença significativa quando comparado estatisticamente.

O androceu é formado por 5 estames férteis, com anteras de deiscência longitudinal, filetes epipétalos, apresentando dois níveis de altura no tubo floral, nas flores brevistilas e longistilas (Fig. 1). As anteras dos dois morfos florais não apresentaram diferenças significativas em relação ao tamanho, entretanto o número de grãos de pólen por flor foi significativamente diferente quando comparados estatisticamente ( $U=94$ ;  $g.l.=1$ ;  $P<0,05$ ) (Tab. 1). A técnica de acetólise não pode ser aplicada aos grãos de pólen de *Psychotria barbiflora* devido à fragilidade da exina, ocorrendo o rompimento e a total deformação. Entretanto, a análise da morfometria polínica, utilizando-se flores frescas, demonstrou que os grãos de pólen das duas formas florais são esféricos e inaperturados, apresentando diferenças significativas no diâmetro, sendo maior nas flores brevistilas (Tab. 1). A viabilidade polínica das flores brevistilas e longistilas foi alta, em torno de 98 e 97%, enquanto que a razão pólen-óvulo foi de 1.510 e 1.333, respectivamente (Tab. 2).

O gineceu é composto por ovário ínfero, bicarpelar, bilocular com dois óvulos, um em cada lóculo (Fig. 1). O estilete apresenta estigma bifido, com papilas por toda a superfície, sendo que nas flores brevistilas a superfície estigmática é maior e com papilas arredondadas, enquanto que nas flores longistilas, a superfície estigmática é menor e as papilas são alongadas e maiores do que nas flores brevistilas.

O comprimento dos estiletos e a altura das anteras nas flores brevistilas foram, em média, 4,3 mm e 6,1 mm, respectivamente, enquanto que nas flores longistilas foi de 7,9 mm e 4,4 mm, respectivamente (Tab. 3). Através do teste de Mann-Whitney (teste  $U$ ), não foi constatada diferença significativa em relação ao comprimento do estilete das flores brevistilas e a altura das anteras das flores longistilas, entretanto, a relação entre o comprimento do estilete das flores longistilas e a altura das anteras das flores brevistilas mostrou diferença significativa ( $U=100$ ;  $g. l.=1$ ;  $P<0,001$ ).

A antese das flores de *P. barbiflora* inicia por volta das 4:30h, com a distensão lenta dos lobos da corola. Por volta das 5:00h, as flores já estão completamente abertas com o estigma receptivo e as anteras deiscentes. Diariamente abrem de 1 a 6 flores por inflorescência, tanto nos indivíduos brevistílicos quanto nos longistílicos. O néctar começa a ser produzido, no nectário em forma de disco localizado na base do estilete, logo após a abertura das flores até o final da manhã, por volta das 13:00h, quando o perianto, androceu e o estilete da flor escurecem e caem, ficando apenas o ovário aderido a inflorescência. O volume e a concentração de açúcares do néctar foi medido em ambos os morfos florais, sendo verificado uma maior produção na primeira parte da manhã (Fig. 2). O volume total produzido e acumulado durante o período de duração das flores isoladas é 0,85 $\mu$ l, mantendo os níveis de concentração, em ambos os morfos florais.

Durante o período de estudo, *P. barbiflora* iniciou a floração no final de abril e início de maio, estendendo-se até julho, com um pico de produção de flores ocorrendo em meados de junho. A frutificação teve início em junho, estendendo-se até meados de setembro. O tempo de desenvolvimento dos frutos é de, aproximadamente, três meses. Os frutos, no início do desenvolvimento, apresentam a coloração esverdeada e quando amadurecem tornam-se arroxeados.

A análise do crescimento do tubo polínico mostrou que, nos testes de autopolinização manual em flores longistilas, a reação de incompatibilidade ocorre no segundo terço do estilete, cerca de 12 horas após a polinização (Fig. 3). Para os cruzamentos feitos entre os tipos morfológicos iguais, foi verificado que os tubos polínicos pararam de crescer 12 horas após a polinização, com a formação de “plugs” de calose no início do estilete (Figs. 4 e 6). Quando foi feito o teste de autopolinização manual em flores brevistilas, pode-se verificar que os tubos polínicos pararam de crescer ainda no estigma, 12 horas após a polinização (Fig. 5). Nos cruzamentos intermorfos, os tubos polínicos chegam ao ovário 12 horas após a polinização (Fig. 7) e penetram no óvulo antes das 24 horas depois da polinização.

Os resultados dos experimentos de polinização manual mostraram a formação de frutos apenas nos cruzamentos intermorfos e o percentual de frutos formados em condições naturais foi de 28 e 14,6% nas flores brevistilas e longistilas, respectivamente (Tab. 4).

Os visitantes florais de *P. barbiflora* foram abelhas e vespas, sendo registradas um total de cinco espécies (Tab. 5). As visitas às flores ocorrem principalmente entre 6:00h e 10:30h, período da manhã em que há maior produção de néctar, e em menor frequência entre 11:00h e 12:30h, período em que as flores estão com pouco néctar e com as anteras vazias.

As abelhas *Trigona fulviventris* e *Trigona spinipes* foram os visitantes mais frequentes, nos dois morfos florais, iniciando a coleta, tanto de néctar quanto de pólen, por volta das 6:00h (Fig. 8 e 9). Durante as visitas às flores brevistilas para coleta de néctar, as abelhas agarravam-se aos lobos da corola e introduziam parte do corpo dentro da flor, ficando os grãos de pólen aderidos nas regiões ventral e dorsal do tórax, enquanto que a cabeça contactava a área estigmática. Entretanto, quando a coleta de néctar era feita em flores longistilas, o local de deposição dos grãos foi, apenas, na região superior da cabeça e o contato com o estigma feito, na maioria das vezes, com a região ventral do tórax e menos frequentemente com a região dorsal do tórax. As visitas para coleta de néctar duravam cerca de dois a três segundos e na maioria das vezes todas as flores abertas por inflorescências eram visitadas pelas abelhas. Para a coleta de pólen nas flores brevistilas, as abelhas pousavam nos lobos da corola e com as pernas anteriores, em movimentos rápidos, faziam a coleta, sendo a deposição do pólen na região ventral do tórax. Em seguida, ainda na flor, rapidamente transferiam os grãos do tórax, com auxílio das pernas anteriores e medianas, para as pernas posteriores. Nas flores longistilas, as abelhas agarravam-se aos lobos da corola, com as pernas medianas e posteriores e,

introduzindo parte do corpo no tubo floral, coletavam os grãos com as pernas anteriores e transferiam para a região ventral do tórax. Durante a coleta de pólen, as abelhas não entraram em contato com o estigma das flores brevistilas, enquanto que nas flores longistilas, poucas vezes o estigma tocou a região dorsal do tórax.

As abelhas *Ceratinula* sp. apresentaram comportamento de pilhagem, uma vez que, coletavam néctar por fora do tubo da corola, tanto em flores brevistilas quanto nas longistilas (Fig. 10).

As abelhas sp.1 foram vistas, ocasionalmente, coletando apenas néctar, nos dois morfos florais, por volta das 8:30h. Em vôo rápido, pousavam nos lobos reflexos da corola e introduzindo parte do corpo no tubo floral, contactavam o estigma das flores brevistilas com a cabeça, local de deposição dos grãos das flores longistilas. A região dorsal do tórax foi o local de contato do estigma das flores longistilas e deposição de pólen das flores brevistilas.

A espécie de vespa da família Scoliidae, muito freqüente, iniciava as visitas para coleta de néctar, nos dois morfos florais, entre 8:00h e 9:00h, estendendo-se até, aproximadamente, 12:00h. Aproximando-se da flor lentamente, as vespas pousavam nos lobos da corola e, introduzindo a cabeça no tubo floral, coletavam o néctar. Nas flores brevistilas os grãos de pólen ficavam aderidos nas regiões ventral e dorsal do tórax, local de contato com o estigma das flores longistilas, enquanto que a deposição dos grãos das flores longistilas ocorria na região superior da cabeça, sendo este o mesmo local de contato do estigma das flores brevistilas. As visitas em cada flor duravam, aproximadamente, de três a quatro segundos, e a coleta de néctar era feita em todas as flores abertas por indivíduo.

## Discussão

A heterostilia tem sido relatada para várias espécies de Rubiaceae, incluindo a tribo Psychotrieae com cerca de 122 espécies (Bahadur 1968 *apud* Jung-Mendaçolli & Melhem 1995) e sendo, principalmente observada no gênero *Psychotria* (Vuilleumier 1967; Ganders 1979; Bawa & Beach 1983; Lima 1988; Barrett & Richards 1990; Hamilton 1990; Pérez-Nasser *et al.* 1993; Stone 1995 e 1996; Grandisoli 1997). As flores de *Psychotria barbiflora*, do Parque Estadual de Dois Irmãos, apresentaram heterostilia do tipo distílica, que havia sido registrada, também na mesma espécie, por Monteiro *et al.* (1991), em cerrado, no estado de São Paulo. Os indivíduos brevistílicos e longistílicos ocorreram na mesma proporção, indicando isopletia para a espécie, mostrando um equilíbrio entre os morfos compatíveis sendo, esta mesma proporção registrada para *P. barbiflora* e *P. suterella*, em São Paulo, por Monteiro *et al.* (1991) e Grandisoli (1997), respectivamente.

O dimorfismo polínico, também foi relatado em *Psychotria nemorosa*, *P. suterella* e *P. vellosiana*, sendo os grãos maiores nas flores brevistilas, apresentando, nos dois morfos florais, forma esférica e do tipo polínico inaperturado (Jung-Mendaçolli & Melhem 1995) e em *P. leiocarpa* (Lima 1988), como observado aqui para *P. barbiflora*. Vale ressaltar que, ao utilizar a técnica de acetólise nos grãos desta espécie, ocorreram deformações por amassamento e rompimento da exina, fato observado para algumas espécies de *Psychotria* por Jung-Mendaçolli & Melhem (1995). Segundo Darwin (1877 *apud* Ganders 1979), a diferença no tamanho dos grãos de pólen, entre os morfos florais heterostílicos, está relacionada com a quantidade de reserva nutritiva, sendo os grãos de flores brevistilas maiores por possuírem mais reserva para emitir tubos polínicos através dos longos estiletos das flores longistilas, porém não existe nenhuma evidência.

As características diferenciais entre os morfos florais, são referenciadas de uma forma geral para as espécies heterostílicas, por Vuilleumier (1967) e Ganders (1979), os quais associam essas dimensões recíprocas entre os grãos de pólen, superfície e papilas estigmáticas nos morfos florais, com o sucesso nos cruzamentos legítimos, diminuindo ou anulando a possibilidade dos cruzamentos ilegítimos, os quais poderiam produzir genes deletérios.

Os estigmas dos morfos florais podem diferir na forma, na área receptiva e, mais comumente, no tamanho das papilas estigmáticas, com flores longistilas apresentando área estigmática menor mas, recoberta por papilas maiores, quando comparado com as flores brevistilas (Ganders 1979; Dulberger 1992). Além da co-relação entre o tamanho das papilas estigmáticas e os grãos de pólen das flores distílicas, o aumento da área estigmática das flores brevistilas, pode ter ocorrido, no decorrer da evolução da heterostilia, devido a menor exposição à carga polínica, por essas flores apresentarem o estilete curto e localizado dentro do tubo floral, enquanto que as flores longistilas não necessitariam de uma grande área estigmática, por esta ser externa ao tubo floral e, conseqüentemente, mais exposta à carga de pólen. Entretanto, Feinsinger & Busby (1987), ao compararem o padrão do transporte de pólen nos morfos florais de *Palicourea lasiorrachis*, sugeriram que as diferenças no tamanho dos estigmas podem contribuir para um transporte assimétrico de pólen, pois as flores longistilas possuem uma área estigmática menor e, dessa forma, menos grãos de pólen seriam depositados.

Com relação à produção dos grãos de pólen em *Psychotria barbiflora*, foi observado que as flores brevistilas produziram mais, fato relatado para *Palicourea lasiorrachis* (Feinsinger & Busby 1987), divergindo da característica geral das espécies heterostílicas, de que as flores longistilas produzem mais grãos por estes serem menores (Ganders 1979). No entanto, Dulberger (1992), comenta que algumas espécies podem apresentar, ou não, variações em relação à produção de grãos de pólen entre os morfos, inclusive ser maior nas flores brevistilas.

Ainda tratando das características morfológicas entre as flores distílicas de *P. barbiflora*, foi observado que a relação entre o comprimento do estilete das flores longistilas e a altura das anteras das flores brevistilas foi significativamente diferente, não apresentando reciprocidade. Segundo Darwin (1877 *apud* Ganders 1979), em muitas espécies heterostílicas o posicionamento recíproco entre os estiletos e estames pode ser exato, embora em muitos casos não seja perfeito. De fato, em *P. barbiflora* esta relação não foi perfeita, indicando que há um maior dimorfismo no comprimento dos estiletos, entre as formas florais, do que na altura das anteras. Levando em consideração que os filetes são epipétalos, o dimorfismo na altura das anteras pode está diretamente associado com a variação no comprimento do tubo floral, o que não ocorreu em *P. barbiflora*. Poucas espécies heterostílicas apresentam diferenças, entre os morfos florais, em relação ao tamanho da corola (Ganders 1979).

O padrão de floração de *P. barbiflora* é do tipo anual, apresentando apenas um ciclo de floração por ano, com duração intermediária (1-5 meses) e padrão regular, tanto ao nível individual, quanto ao nível populacional, de acordo com Newstrom *et al.* (1994) e do tipo *steady-state* (*sensu* Gentry 1974), com poucas flores abertas por dia, o que pode promover um maior deslocamento dos polinizadores entre os indivíduos, e entre os morfos florais, aumentando, dessa forma, a possibilidade de xenogamia.

Diversas características das flores de *P. barbiflora* estão de acordo com a descrição, feita por Endress (1994), para a polinização por abelhas pequenas (espécies do gênero *Trigona*) e por vespas tais como, flores actinomorfas, pétalas brancas, corola formando um tubo curto e pouca produção de néctar e pólen. Segundo Faegri & Pijl (1979), as flores polinizadas por vespas são pequenas, apresentando cores opacas e com o néctar de fácil acesso, corroborando as características encontradas aqui para *P. barbiflora*.

A concentração de açúcares do néctar, nas flores de ambos os morfos de *P. barbiflora*, concorda com a amplitude de concentração para flores polinizadas por vespas (Percival 1965), porém, o baixo volume produzido, induz a repetidas visitas pelos animais, em busca de alimento, e, conseqüentemente, promove a polinização cruzada (Faegri & Pijl 1979; Proctor *et al.* 1996).

De uma forma geral, as espécies de Rubiaceae apresentam grande variedade de animais visitantes às suas flores e, apesar de existirem poucas informações a este respeito, em algumas espécies de *Psychotria* há registros de abelhas e vespas. Abelhas do gênero *Trigona* foram referenciadas como os únicos polinizadores de *P. marginata* (Hamilton 1990). Em *P. suerrensis*, foram observadas sete espécies de abelhas, dentre elas *Trigona fulviventris*, e algumas vespas, mas estas não foram os polinizadores mais eficientes, sendo considerados assim, espécies de *Euglossa* e *Exaerete* (Stone 1996). De fato, abelhas do gênero *Trigona* foram os principais polinizadores de *P. barbiflora*, juntamente com uma espécie de vespa da família Scoliidae, as quais demonstraram ser

aptas para o transporte de pólen entre os morfos florais, principalmente por apresentarem deposição dos grãos de pólen no corpo, correlacionados com a posição dos estigmas de flores brevistilas e longistilas. Segundo Percival (1969) e Faegri & Pijl (1979), as vespas não são consideradas grandes polinizadores, principalmente por apresentarem um aparelho bucal primitivo, com a língua achatada, e por consumir néctar apenas como suplemento alimentar.

As abelhas e vespas foram observadas visitando as flores de *P. barbiflora* em maior frequência, principalmente na primeira parte da manhã, até aproximadamente 10:00h, fato que pode estar relacionado com a maior produção de néctar nesse período. Além disso, a disponibilidade dos grãos de pólen foi maior, também, na primeira parte da manhã, estando as anteras quase que totalmente vazias após 11:00h. Entretanto, foram observados poucos indivíduos, tanto das abelhas do gênero *Trigona* como da espécie de Scoliidae visitando as flores, principalmente nas áreas onde os indivíduos de *P. barbiflora* apresentavam distribuição mais agregada, apresentando uma maior quantidade de flores abertas, o que teoricamente aumentaria o número de visitantes em busca de recursos como o néctar e o pólen.

Os resultados dos experimentos de polinização, em campo, mostraram que houve uma maior formação de frutos nas polinizações cruzadas manuais intermorfos do que no controle. Este fato pode estar relacionado com a ocorrência de poucos indivíduos de abelhas e vespas visitando as flores, principalmente no período de pico na floração, apesar de terem sido, de certa forma eficientes pois, todos os frutos formados, no tratamento de controle, apresentaram duas sementes. Há de se levar em consideração que, os indivíduos de formas florais semelhantes e opostas de *P. barbiflora*, estavam localizados próximos entre si, nas trilhas em que o estudo foi desenvolvido, não sendo a distância, entre os morfos, um fator limitante para abelhas pequenas como *Trigona*, no transporte da carga polínica. Por outro lado, pode ser que, pelo fato dos indivíduos estarem próximos entre si, tenha ocorrido a deposição de grãos incompatíveis no estigma das flores e, com isso, a produção de frutos tenha sido baixa em relação ao número de frutos formados por polinizações manuais cruzadas. Em compensação, os resultados do número de frutos formados nas polinizações cruzadas mostraram um bom percentual nos dois morfos, indicando a possível capacidade máxima da espécie na formação de frutos.

A formação de frutos em flores não manipuladas, controle, foi diferente entre os morfos florais, tendo um maior sucesso nas flores brevistilas. O fluxo assimétrico de pólen entre os morfos é considerado comum nas espécies heterostílicas, sendo que, muitos autores chegaram a conclusão de que o estigma das flores longistilas recebe mais grãos de pólen ilegítimos, por estarem mais expostos, do que os estigmas das flores brevistilas (Ganders 1979; Dulberger 1992). Os visitantes de *P. barbiflora*, podem ter promovido a geitonogamia nas flores, principalmente, nas longistilas, com um acúmulo de grãos de pólen incompatíveis dificultando ou impossibilitando a germinação dos

grãos compatíveis e, conseqüentemente, diminuindo a formação de frutos. Um outro fator que pode ter influenciado nessa baixa formação de frutos é a possibilidade de, durante algumas visitas às flores longistilas, não ter ocorrido o contato do corpo do animal com a superfície estigmática, fato que foi questionado por Stone (1995) para *Psychotria suerrensis*. Monteiro *et al.* (1991) observaram que as plantas com flores longistilas formaram mais frutos do que as brevistilas, atribuindo esse resultado às possíveis funções feminina e masculina, respectivamente, em *P. barbiflora* no cerrado, fato que não foi observado para *P. barbiflora* neste trabalho, sendo verificado o resultado oposto, ou seja, uma maior formação de frutos nas flores brevistilas.

O sistema de auto-incompatibilidade heteromórfico envolve um mecanismo esporofítico em que a reação do pólen é determinada pelo genótipo do esporófito parental, sendo esta reação podendo ser observada em locais diferentes nos dois morfos (Gibbs 1986; Dulberger 1992). Em *Psychotria barbiflora*, nas autopolinizações de flores brevistilas, observou-se que os tubos polínicos pararam de crescer na superfície estigmática e este resultado foi, também, relatado para nove de 10 espécies de Rubiaceae estudadas por Bawa & Beach (1983), assim como em *Manettia luteo-rubra* (Passos & Sazima 1995) e *Psychotria suterella* (Grandisoli 1997). Segundo Gibbs (1990), as espécies com auto-incompatibilidade heteromórfica, apresentam rejeição ao nível estigmático, principalmente, em autopolinizações de flores brevistilas. Entretanto, na autopolinização de flores longistilas, a inibição dos tubos polínicos ocorreu na região mediana do estilete, assim como em *P. chiapensis* e *P. officinalis* (Bawa & Beach 1983). Nos cruzamentos intramorfos de flores brevistilas e longistilas, o local de inibição dos tubos polínicos foi no começo do estilete, logo abaixo do estigma. De acordo com Bawa & Beach (1983), para as 10 espécies de Rubiaceae estudadas, o local de inibição dos tubos polínicos nos cruzamentos intramorfos de flores brevistilas foi na superfície estigmática, enquanto que houve variação, do estigma até a base do estilete, na inibição dos tubos polínicos das flores longistilas. Estes resultados em *P. barbiflora* indicam que a incompatibilidade foi mais fortemente expressada nas flores brevistilas, principalmente pelo fato de, nas autopolinizações, os tubos polínicos nem terem sido emitidos, diferentemente das flores longistilas, em que a reação ocorreu, apenas, mais tardiamente.

A razão pólen-óvulo para as flores brevistilas e longistilas de *Psychotria barbiflora* corresponde com o tipo de sistema reprodutivo envolvendo a xenogamia facultativa proposta por Cruden (1977). Entretanto, outros métodos como, os testes de polinizações manuais e a análise do crescimento do tubo polínico, utilizados para avaliar o sistema reprodutivo em *P. barbiflora*, mostra que a espécie apresenta xenogamia obrigatória, dependendo, dessa forma, da eficiência dos polinizadores para manutenção desta espécie.

## Agradecimentos

À Daniela Zappi, pela identificação de *Psychotria barbiflora*; a Paulo Eugênio Oliveira pelas sugestões ao manuscrito, à Ariadna Valentina Lopes, pela ajuda com bibliografias e sugestões; a Oscar Teixeira Basto Jr., Jano Gomes Teixeira e Flaviano A. Gomes Teixeira, pela ajuda e companhia nos trabalhos de campo, à Isa Regina Leite, Ana Virgínia Leite e Cleci Neves, pela ajuda no campo e no laboratório; à Marina Machado Adeodato, pela confecção do abstract; a André Santos, pela ajuda nos cálculos estatísticos, à Ana Emília e Reginaldo, pela ajuda na utilização do microscópio de fluorescência, a Celso Martins, pela identificação da vespa e ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

## Referências Bibliográficas

- Andrade-Lima, D. 1961. Tipos de florestas de Pernambuco. **Anais da Associação dos Geógrafos Brasileiros 12**: 69-85.
- Barrett, S. C. H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: Barrett, S. C. H. (ed.). **Evolution and function of heterostyly**. pp. 1-24. Monographs on Theoretical and Applied Genetics. Springer-Verlag, Berlin. 279p.
- Barrett, S. C. H. & Richards, J. H. 1990. Heterostyly in tropical plants. **Memoirs of the New York Botanical Garden 55**: 35-61.
- Bawa, K. S. & Beach, J. H. 1983. Self-incompatibility systems in the Rubiaceae of a tropical lowland wet forest. **American Journal of Botany 70**: 1281-1288.
- Cruden, R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution 31**: 32-46.
- Dulberger, R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In: S.C.H. Barrett (ed.) **Evolution and function of heterostyly**. pp. 41-84. Monographs on Theoretical and Applied Genetics. Springer-Verlag, Berlin. 279p.
- Endress, P. K. 1994. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge University Press, Cambridge. 511p.
- Faegri, K. & Pijl, L. 1979. **The principles of pollination ecology**. London, Pergamon Press 3<sup>o</sup>. 244p.
- Feinsinger, P. & Busby, W. H. 1987. Pollen carryover: experimental comparisons between morphs of *Palicourea lasiorrachis* (Rubiaceae), a distylous, bird-pollinated, tropical treelet. **Oecologia 73**: 231-235.
- Ganders, F. R. 1979. The biology of heterostyly. **New Zealand Journal of Botany 17**: 607-635.
- Gentry, A. H. 1974. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. **Biotropica 6**: 64-68.
- Gibbs, P. 1986. Do homomorphic and heteromorphic self-incompatibility systems have the same sporophytic mechanism? **Plant Systematics and Evolution 154**: 285-323.
- Gibbs, P. 1990. Self-incompatibility in flowering plants: a neotropical perspective. **Revista brasileira de Botânica 13**: 125-136.
- Grandisoli, E. A. C. 1997. **Biologia reprodutiva e estrutura da população de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) em um fragmento de mata secundária em São Paulo**. Universidade Estadual de São Paulo. São Paulo. Dissertação de Mestrado.



- Hamilton, C. W. 1990. Variations on a distylous theme in Mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). **Memoirs of the New York Botanical Garden** **55**: 62-75.
- Jung-Mendaçolli, S. & Melhem, T. 1995. Grãos de pólen de espécies heterostílicas de Rubiaceae. **Revista brasileira de Botânica** **18**: 61-93.
- Kohn, J. R. & Barrett, S. C. 1992. Experimental studies on the functional significance of heterostyly. **Evolution** **46**: 43-55.
- Lima, H. A. 1988. Heterostilia em *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schl. (Rubiaceae). **Boletim do Museu Nacional** **76**: 1-16.
- Mabberley, D. J. 1993. **The Plant-Book. A portable dictionary of the higher plants**. Cambridge University Press 4ed. 706p.
- Machado, I. C.; Lopes, A. V. & Pôrto, K. C. 1998. **Reserva Ecológica de Dois Irmãos: Estudos em um remanescente de Mata Atlântica em área urbana**. SECTMA (Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente) Editora Universitária-UFPE-Recife.
- Martin, F. W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technology** **34**: 125-128.
- Monteiro, R.; Nakajima, J. N.; Ribeiro, J. L. S. & Toledo, J. C. 1991. Morfologia e distribuição espacial das formas heterostílicas de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). **Naturalia** **16**: 137-146.
- Newstrom, L. E.; Frankie, G. W. & Baker, H. G. 1994. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in Lowland Tropical Rain Forest Trees at La Selva, Costa Rica. **Biotropica** **26**: 141-159.
- Ornduff, R. 1974. Heterostyly in South African flowering plants: A conspectus. **Journal of South African Botany** **40**: 169-187.
- Passos, L. & Sazima, M. 1995. Reproductive biology of the distylous *Manettia luteo-rubra* (Rubiaceae). **Botanica Acta** **108**: 309-313.
- Percival, M. 1965. **Floral Biology**. Pergamon Press. London. 243p.
- Pérez-Nasser, N.; Eguiarte, L. E. & Piñero, D. 1993. Mating system and genetic structure of the distylous tropical tree *Psychotria faxlucens* (Rubiaceae). **American Journal of Botany** **80**: 45-52.
- Proctor, M.; Yeo, P. & Lack, A. 1996. **The natural history of pollination**. Harper Collins Publishers, London. 479p.
- Radford, A. E.; Dickinson, W. C.; Massey, J. R. & Bell, C. R. 1974. **Vascular plant systematics**. New York, Harper & Row Publishers. 891p.
- Rizzini, C. T. 1979. **Tratado de fitogeografia do Brasil, 2. Aspectos sociológicos e florísticos**. São Paulo, Ed. da Universidade de São Paulo. 374p.
- Stone, J. L. 1995. Pollen donation patterns in a tropical distylous shrub (*Psychotria suerrensis*; Rubiaceae). **American Journal of Botany** **82**: 1390-1398.
- Stone, J. L. 1996. Components of pollination effectiveness in *Psychotria suerrensis*; a tropical distylous shrub. **Oecologia** **107**: 504-512.
- Vasconcelos-Sobrinho, J. 1949. As regiões naturais de Pernambuco. **Arquivos do Instituto de Pesquisas Agronômicas** **3**: 25-33.
- Vuilleumier, B. S. 1967. The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. **Evolution** **21**: 210-226.
- Zeisler, M. 1938. Über die Abgrenzung der eigentlichen Narbenfläche mit Hilfe von Reaktionen. **Beiheft Botanisches Zentralblatt** **58**: 308-318.

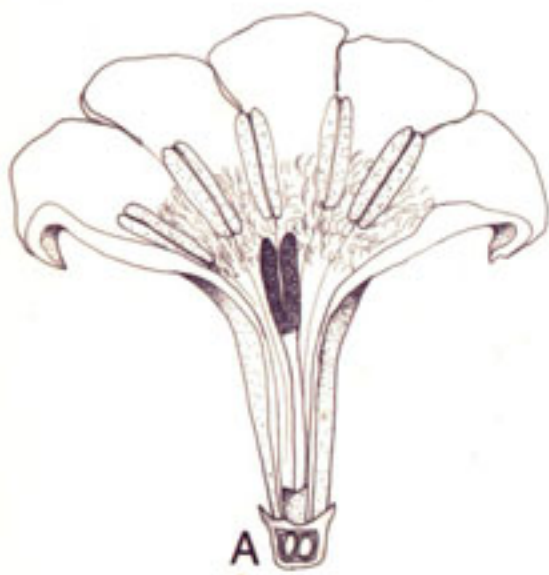
## Legendas das figuras

Figura 1. Esquema das flores de *Psychotria barbiflora* evidenciando as diferenças recíprocas no comprimento do estilete e altura das anteras entre a flor brevistila (A) e longistila (B).

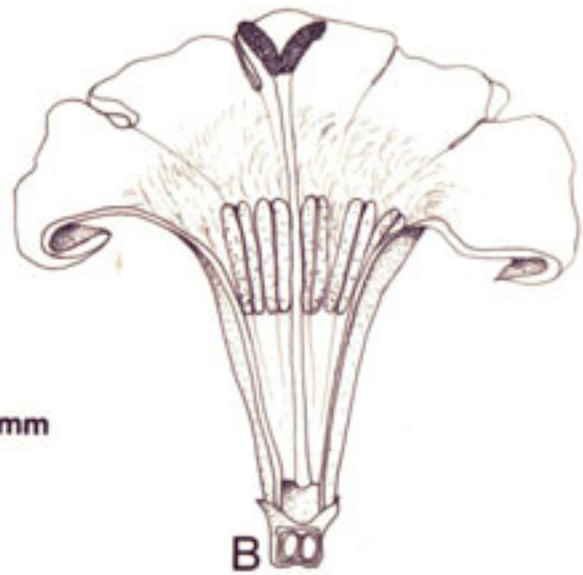
Figura 2. Média do volume e da concentração de açúcares no néctar em flores brevistilas e longistilas (n=20) de *Psychotria barbiflora*.

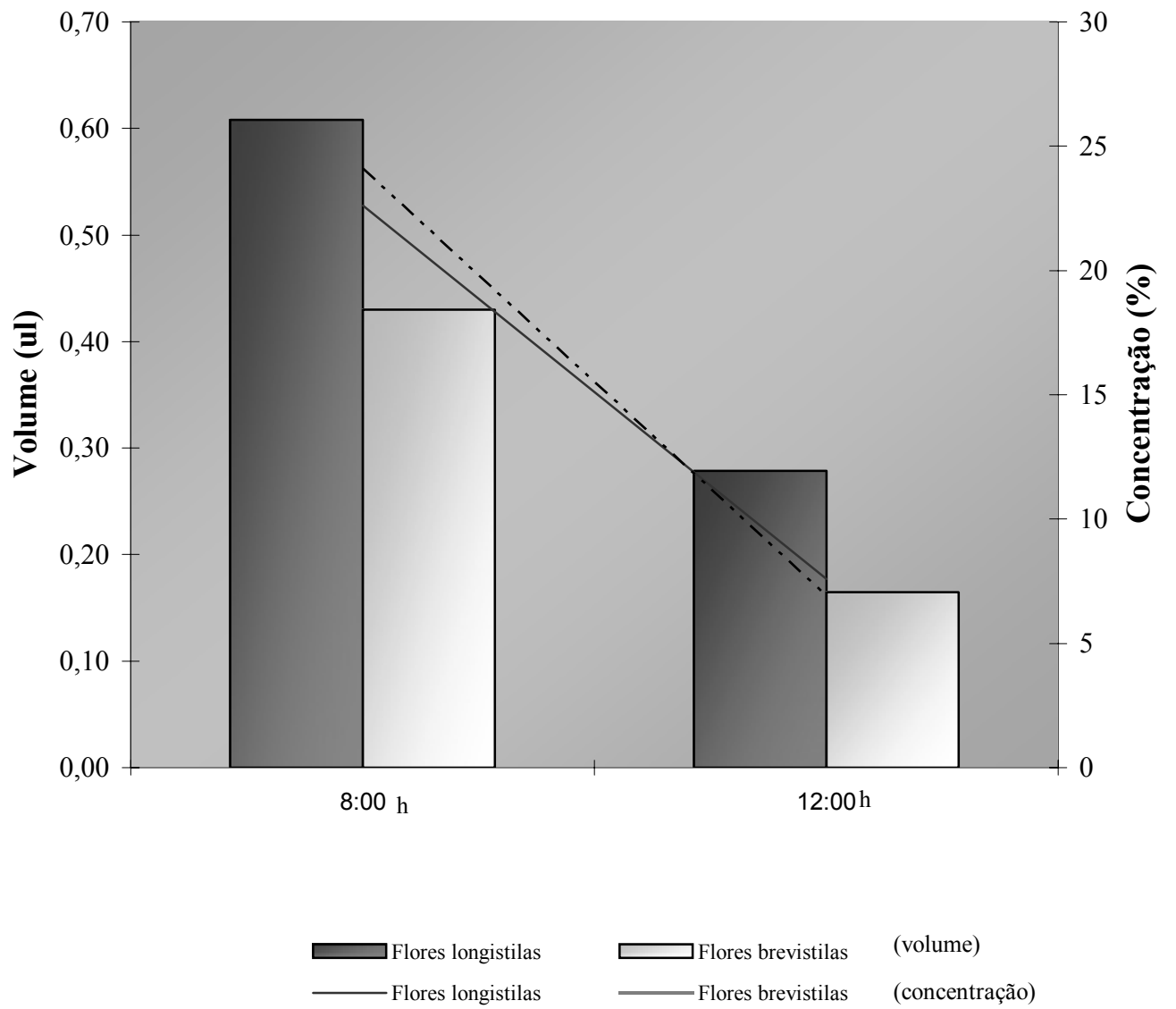
Figuras 3-6. Tubos polínicos, após 12 horas de polinização manual, no gineceu de flores de *Psychotria barbiflora*. Figura 3 – Estilete de flor longistila autopolinizada com a formação de “plugs” de calose. Figura 4 – Cruzamento entre flores longistilas evidenciando a reação de incompatibilidade no início do estilete. Figura 5 – Detalhe do estigma de flor brevistila autopolinizada, mostrando a interrupção do crescimento dos tubos polínicos. Figura 6 – Cruzamento entre flores brevistilas, com reação de incompatibilidade também no início do estilete.

Figuras 7-9 *Trigona fulviventris* coletando néctar em flor brevistila (8) e longistila (9) e *Ceratinula* sp. coletando néctar, por fora do tubo da corola, em flor brevistila (10) de *Psychotria barbiflora*.



2mm





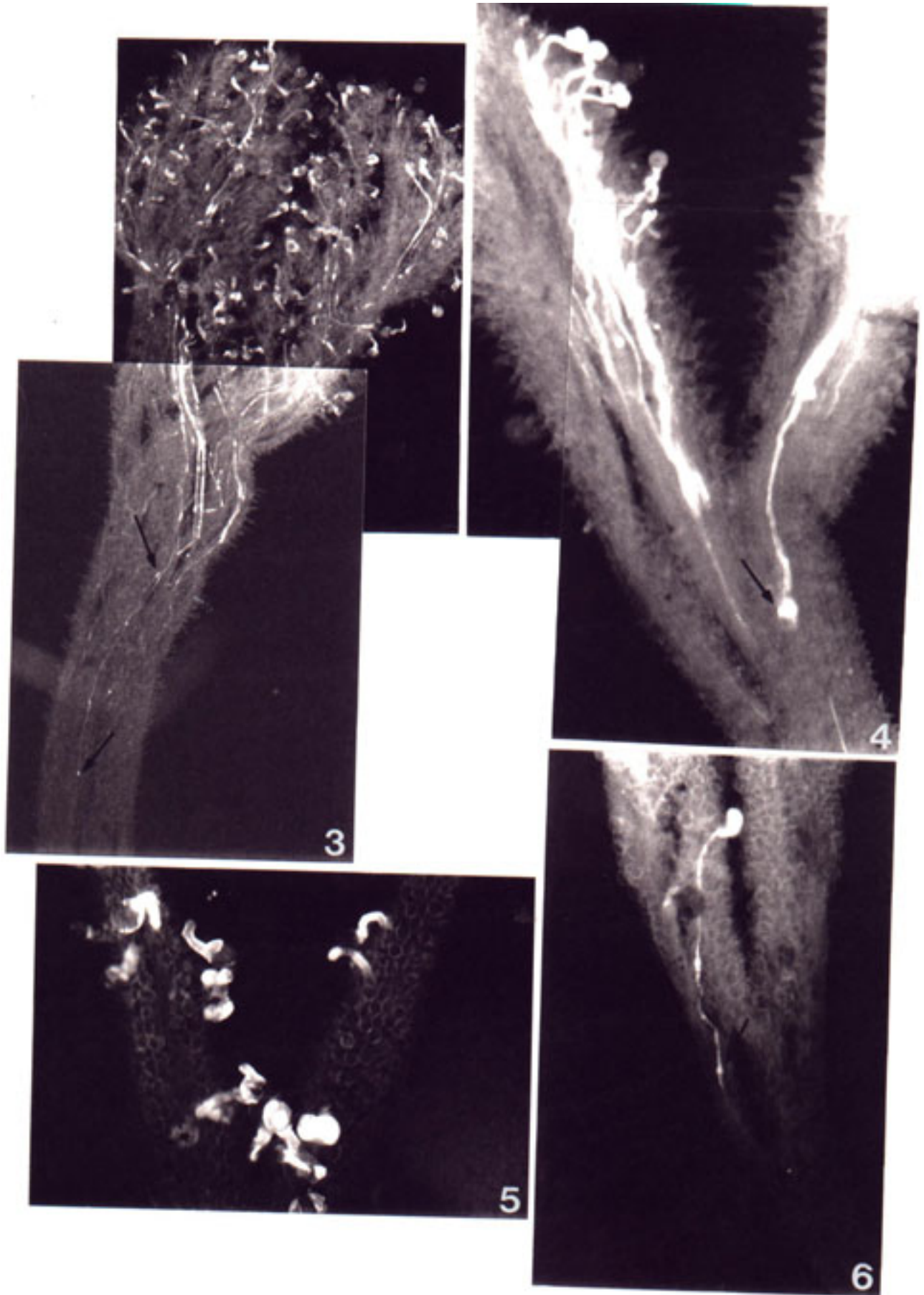




Tabela 1. Medidas do diâmetro dos grãos de pólen inaperturados de *Psychotria barbiflora*.

Tipo de flor	Faixa de variação ( $\mu\text{m}$ )	$x \pm Sx$ ( $\mu\text{m}$ )	S ( $\mu\text{m}$ )	V (%)
Flores brevistilas	60-70	63,62* $\pm$ 0,5	2,6	4,1
Flores longistilas	38,7-55	47,18* $\pm$ 1,3	6,4	13,56

x-Média aritmética de 25 medidas; Sx - Desvio padrão da média; S - Desvio padrão da amostra; V - Coeficiente de variabilidade

Tabela 2. Número de grão de pólen por antera (G/A) e por flor (G/F), razão pólen/óvulo (P/O) e viabilidade polínica (V/P) de *Psychotria barbiflora*.

Tipo de flor	G/A	G/F	P/O	VP
Flores brevistilas	604	3.020	1.510	97,9%
Flores longistilas	533	2.665	1.333	96,7%

N=10

Tabela 3 . Morfometria floral de *Psychotria barbiflora* indicando o comprimento da corola, do estilete e altura das anteras.

Partes florais	Brevistila		Longistila	
	x	SD	x	SD
Comprimento da corola (mm)	6,5	$\pm$ 0,09	6,8	$\pm$ 0,20
Comprimento do estilete (mm)	4,3	$\pm$ 0,15	7,9	$\pm$ 0,23
Altura das anteras (mm)	6,1	$\pm$ 0,12	4,4	$\pm$ 0,23

N=10

Tabela 4. Resultado dos experimentos para verificação do sistema reprodutivo em *Psychotria barbiflora*.

Tratamentos	Flores (n)	Frutos/Sementes (n)	Sucesso (%)
Autopolinização manual (flores brevistilas)	30	0/0	0
Autopolinização manual (flores longistilas)	30	0/0	0
Polinização cruzada			
fl.brevistila* X fl.longistila**	15	7/14	46,6
fl.longistila* X fl.brevistila**	17	12/24	70,5
Controle			
fl. brevistila	110	31/62	28
fl. longistila	150	22/44	14,6

\* Doador de pólen \*\* Receptor de pólen

Tabela 5. Visitantes florais de *Psychotria barbiflora* e respectivas freqüência, recompensa coletada e resultado da visita.

Visitantes	Freqüência	Recompensa Coletada	Resultado da Visita
Apidae			
<i>Trigona fulviventris</i>	MF	P/N	PO
<i>Trigona spinipes</i>	MF	P/N	PO
Anthophoridae			
<i>Ceratinula</i> sp.	PF	N	PI
sp. 1	PF	N	PO
Scoliidae	MF	N	PO

MF – muito freqüente &gt; 6 visitas/hora, PF – pouco freqüente &lt; 6 visitas/hora, P – pólen, N – néctar, PO – polinização, PI - pilhagem



**5. MANUSCRITO ENVIADO AO PERIÓDICO Revista Brasileira de Botânica**

***Sabicea cinerea* Aubl. (Rubiaceae), distília e polinização  
em um fragmento de Floresta Atlântica em Pernambuco, Nordeste do Brasil.<sup>1</sup>**

LUCIANA ALMEIDA GOMES TEIXEIRA<sup>2</sup> e ISABEL CRISTINA MACHADO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Parte da dissertação de mestrado de L. A. G. Teixeira

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, 50372-970. Recife, PE, Brasil. E-mail: [lagt@npd.ufpe.br](mailto:lagt@npd.ufpe.br)

<sup>3</sup> Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, 50372-970. Recife, PE, Brasil. E-mail: [imachado@npd.ufpe.br](mailto:imachado@npd.ufpe.br)

ABSTRACT - (*Sabicea cinerea* Aubl. (Rubiaceae), distyly and pollination in a fragment of Atlantic Rain Forest in Pernambuco, Northeast of Brazil). The reproductive system and pollination biology of *Sabicea cinerea* were studied in the Dois Irmãos State Park, a fragment of Atlantic Forest, in Recife-PE, from May/1998 to December/2000. *Sabicea cinerea* is a vine found in the forest border and which produces flowers throughout the year, with flowering peak in the dry season (which goes from September to February). It presents distylous, actinomorphic, tubular flowers, with white petals. Anthesis begins at about 5.00 p.m. and from this time on the nectar is already available to the floral visitors. Nectar production continues until 4.00 p.m., and its daily mean average volume was 8,0 $\mu$ l and sugar concentration 24%, in both floral types. The short-styled flowers possess larger corolla and pollen grains in relation to the long-styled flowers, but there are no differences in the amount of the grains between the two floral morphs. As floral visitors, two species of hummingbird were observed, *Phaethornis ruber*, the main pollinator, and *Amazilia* sp., as a nectar thief. Besides those hummingbirds, several species of Apidae, Anthophoridae and Halictidae bees, Hesperidae and Nymphalidae butterflies and Syrphidae flies also visited the *Sabicea cinerea* flowers. The self-incompatibility of the species was verified through the tests of controlled pollination, in field, with fruit set only in the intermorphs crossings. The occurrence of the sporophytic self-incompatibility was confirmed with the analysis of the pollen tubes growth, in both floral morphs. The efficiency in the pollen transport among the floral morphs is the main and more important function carried out by the pollinators in order to balance and maintain the *S. cinerea* populations, mainly because it presents an obligatory xenogamous reproductive system.

RESUMO – (*Sabicea cinerea* Aubl. (Rubiaceae), distília e polinização em um fragmento de Floresta Atlântica em Pernambuco, Nordeste do Brasil). O estudo sobre o sistema reprodutivo e a biologia da polinização de *Sabicea cinerea* foi desenvolvido no Parque Estadual de Dois Irmãos, um fragmento de Floresta Atlântica, em Recife-PE, no período de maio/1998 a dezembro/2000. *Sabicea cinerea* é uma espécie lianescente encontrada na borda da mata, que produz flores por todo ano, com um pico na estação seca (setembro a fevereiro). Apresenta flores distílicas, actinomorfas, tubulosas, com pétalas brancas e antese iniciando por volta das 5:00h, horário em que o néctar já está disponível aos visitantes florais. A produção de néctar estende-se até às 16:00h, sendo o volume médio diário de 8,0µl e a concentração média de açúcares de 24%, em ambos os tipos florais. As flores brevistilas possuem a corola e os grãos de pólen maiores em relação às flores longistilas, não havendo entretanto diferenças na quantidade dos grãos entre os dois morfos florais. Como visitantes florais, foram observadas duas espécies de beija-flores, *Phaethornis ruber*, um dos principais polinizadores, e *Amazilia* sp., como pilhador. Além dos beija-flores, várias espécies de abelhas Apidae, Anthophoridae e Halictidae, borboletas Hesperiiidae e Nymphalidae e moscas Syrphidae, visitavam as flores de *Sabicea cinerea*. A auto-incompatibilidade da espécie foi constatada através dos testes de polinização controlada, em campo, que resultaram na formação de frutos apenas nos cruzamentos intermorfos. A análise do crescimento dos tubos polínicos, no laboratório, em ambos os morfos florais, confirmou a ocorrência da auto-incompatibilidade esporofítica. A eficiência no transporte de pólen entre os morfos florais é a principal e mais importante função desempenhada pelos polinizadores, para que ocorra o equilíbrio e a manutenção dos agrupamentos de indivíduos de *S. cinerea*, principalmente por esta apresentar um sistema reprodutivo do tipo xenógamo obrigatório.

Key words – Rubiaceae, *Sabicea*, pollination biology, heterostyly, self-incompatibility.

## Introdução

A família Rubiaceae compreende cerca de 10.400 espécies distribuídas amplamente por todo o mundo, sendo a maioria encontrada na região dos trópicos, apresentando hábitos bastante variados como árvores, arbustos, lianas, ervas, epífitas e raras aquáticas (Mabberley 1993). Esta família é a que possui o maior número de gêneros com heterostilia, dentre as 25 famílias de Angiospermas com representantes heterostílicos (Vuilleumier 1967, Andersson 1973, Ganders 1979, Barrett 1992, Kohn & Barrett 1992).

A heterostilia é um polimorfismo controlado geneticamente, havendo a formação de dois (distília) ou três (tristília) tipos de flores, sendo mais comum a ocorrência da distília, com flores brevístilas e longístilas (Vuilleumier 1967, Ganders 1979, Barrett 1992, Kohn & Barrett 1992). Os dois morfos florais são caracterizados pela diferença no comprimento dos estiletos e estames (hercogamia), diferenças no tamanho e na produção dos grãos de pólen e por possuírem, geralmente, um sistema de incompatibilidade heteromórfico em que os cruzamentos viáveis, com formação de frutos e sementes, ocorrem somente entre flores de diferentes morfos (Ganders 1979, Dulberger 1992, Kohn & Barrett 1992).

Vários estudos feitos com espécies heterostílicas de Rubiaceae enfocam a ocorrência de auto-incompatibilidade (Keegan et al. 1979, Hicks et al. 1985, Feinsinger & Busby 1987, Murray 1990, Passos & Sazima 1995, Pailler & Thompson 1997, Ree 1997), existindo também alguns casos de auto-compatibilidade dentro da família (Sobrevila et al. 1983, Richards & Koptur 1993, Riveros et al. 1995). Esses mesmos trabalhos, de uma forma geral, mencionam a variedade de animais que visitam as flores de Rubiaceae. Este trabalho apresenta a ocorrência de heterostilia do tipo distílica e a polinização de *Sabicea cinerea*, uma espécie lianescente de borda de mata, em um fragmento de Floresta Atlântica de Pernambuco. São feitos comentários sobre o sistema reprodutivo e a importância dos polinizadores na manutenção dos agrupamentos de indivíduos brevístílicos e longístílicos de *Sabicea cinerea*.

## Material e métodos

As observações de campo foram realizadas no Parque Estadual de Dois Irmãos, fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, localizado no município de Recife, estado de Pernambuco (8°7'30"S e 34°52'30"WG), durante o período de maio/1998 a dezembro/2000. O Parque Estadual de Dois Irmãos está localizada à noroeste da cidade do Recife, com uma área de, aproximadamente, 370 ha. O clima é do tipo As', tropical costeiro, quente e úmido, com temperaturas médias mensais superiores a 23°C, apresentando um período de alta umidade entre os meses de março e agosto, com precipitações máximas ocorrendo em junho e julho (Coutinho et al. 1998).

Foram registradas informações sobre a morfologia das flores, cor, duração, horário e seqüência da antese, receptividade do estigma, número de flores abertas por inflorescência, além da disponibilidade de néctar e pólen, em indivíduos agrupados em quatro manchas distintas e separadas, duas de flores brevistilas e duas de flores longistilas, localizadas na borda da mata, ocupando uma área aproximada de 240 m<sup>2</sup> e 60 m<sup>2</sup>, respectivamente. Por ser uma liana e por apresentar reprodução vegetativa mais fortemente nas áreas dos indivíduos longistílicos, principalmente no período de baixa produção de flores, na estação seca, foi impossível fazer a contagem do número total de indivíduos, sendo registrado apenas o tamanho dos agrupamentos.

Os aspectos relacionados com a fenologia da floração e da frutificação como, emissão de botões, flores, frutos verdes e maduros, foram acompanhados semanalmente no campo, em dois agrupamentos brevistílicos e dois longistílicos. De acordo com as classificações de Gentry (1974) e Newstrom et al. (1994), foi determinado o padrão de floração da espécie.

Foram feitos desenhos esquemáticos, em câmara clara acoplada a microscópio estereoscópico, de flores brevistilas e longistilas, detalhando as características morfológicas como tamanho da corola, altura das anteras e comprimento do estilete. O número total de óvulos por ovário foi verificado, também, sob microscópio estereoscópico. A contagem do número de grãos de pólen, por antera, foi feita utilizando-se câmara de Neubauer, segundo a metodologia proposta por Maêda (1985), sendo

posteriormente efetuada a razão pólen/óvulo (Cruden 1977). A viabilidade dos grãos de pólen foi determinada através da técnica de coloração do citoplasma pelo carmim acético 1,2% (Radford et al. 1974), utilizando-se pólen proveniente de 10 flores de cada morfo. A análise da morfometria polínica, nos dois morfos, foi realizada utilizando-se a técnica de acetólise (Erdtman 1966), sendo medidos os diâmetros polar e equatorial de 25 grãos, distribuídos ao acaso em 10 lâminas, e os resultados comparados pela análise de variância. As medidas de tamanho das flores, comprimento dos estames e estiletes, número e tamanho dos grãos de pólen foram comparados estatisticamente pelo teste *U* (Mann-Whitney / Systat 6.0.1).

Para medir a concentração de açúcares e o volume do néctar foram utilizados, respectivamente, refratômetros de bolso e micro-seringas ( $\mu$ l), em 10 flores, cinco de cada morfo, ensacadas no dia anterior à antese, em vários horários do dia. A receptividade do estigma foi determinada, em campo, através da técnica do peróxido de hidrogênio (Zeisler 1938).

Para análise do sistema reprodutivo de *Sabicea cinerea*, foram feitos experimentos de autopolinização manual e polinização cruzada intermorfos (Radford et al. 1974), sendo utilizados botões, em fase de pré-antese, isolados com sacos de papel semi-permeável e, no dia posterior, por ocasião da antese, a polinização desejada foi efetuada. O controle foi feito a partir da marcação flores de cada morfo e, posteriormente, contados os números de frutos e sementes formados. A verificação do crescimento do tubo polínico foi feita, através de cruzamentos em laboratório, utilizando-se flores mantidas em caixas de acrílico com ágar 2%. As flores polinizadas foram fixadas em FAA 70%, em intervalos de 8, 12, 24 e 48 h, posteriormente foram tratadas, coradas com azul de anilina e analisadas em microscópio de fluorescência (Martin 1959).

Foram feitas observações periódicas sobre a atividade e o comportamento dos visitantes florais, registrando-se a frequência, a duração e o horário das visitas, assim como o recurso floral procurado e o resultado das visitas (polinização ou pilhagem). As observações visuais sobre os visitantes às flores foram documentadas com fotografias e filmagem em vídeo. A frequência dos visitantes florais foi verificada ao longo de 50 horas, em cinco dias não consecutivos, e registrado os animais e o

número de visitas a cada hora. Alguns insetos visitantes foram coletados com auxílio de rede entomológica e posteriormente montados a seco para identificação. Os beija-flores foram identificados, por comparação, usando-se bibliografia especializada (Sick 1985; Grantsau 1989). Os espécimes-testemunho das abelhas, moscas e mariposas diurnas encontram-se depositados na coleção de insetos polinizadores do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva (Departamento de Botânica-UFPE). Amostras do material botânico, também foram coletados, herborizados e depositados como espécimes-testemunho no herbário do Departamento de Botânica da UFPE (UFP n<sup>os</sup> 27.893 e 27.895).

## Resultados

*Sabicea cinerea* é uma liana, cujos indivíduos formam manchas encontradas exclusivamente nas bordas da mata, principalmente em locais bastante ensolarados. Os ramos flexíveis podem ocupar diferentes estratos da mata, ocorrendo em alturas que variam de 50 cm a 5 m, dependendo do porte (arbustivo ou arbóreo) da espécie suporte. A caracterização morfológica das flores indicou a ocorrência de heterostilia do tipo distílica (figura 1), com dois agrupamentos de indivíduos longistílicos e dois de indivíduos brevistílicos, sendo encontrada a proporção de 1:1.

A produção de flores ocorre durante todo ano com um pico na estação de baixa pluviosidade (de setembro até o final de fevereiro). Durante o período de pico de floração, os agrupamentos brevistílicos e longistílicos apresentaram cerca de 15 e 60 flores abertas por dia, respectivamente, sendo este último, maior em área total ocupada pelos indivíduos. Foi verificado que, principalmente, nos meses de alta pluviosidade e mínima produção de flores, os agrupamentos apresentaram alta reprodução vegetativa.

As inflorescências são cimosas axilares, dispostas lateralmente, com cerca de 15 a 20 flores densamente agrupadas em forma de glomérulo, abrindo-se de uma a três flores por dia. As flores são brancas, tubulosas, actinomorfas, pentâmeras, apresentando muitos pêlos em toda face interna e



externa da corola. O comprimento médio das flores brevistilas e longistilas é de 30 mm e 25 mm ( $n = 10$ ), apresentando diferença significativa quando comparado estatisticamente ( $U = 88$ ;  $g. l. = 1$ ;  $P < 0,05$ ).

O androceu é formado por 5 estames férteis, com anteras de deiscência longitudinal, filetes epipétalos, apresentando dois níveis de altura no tubo floral (figura 1). O tamanho das anteras e o número de grãos de pólen produzidos por flor não apresentaram diferenças significativas entre os dois morfos florais (tabela 1). O percentual de grãos de pólen viáveis foi alto, 88% e 89%, enquanto que a razão pólen-óvulo foi, aproximadamente, 500 e 480 para os morfos brevistílicos e longistílicos, respectivamente (tabela 1). Os grãos de pólen das duas formas florais são triporados, apresentando diferenças significativas nos diâmetros polar e equatorial, sendo maiores nas flores brevistilas (tabela 2).

O gineceu é composto por ovário ínfero, pentacarpelar, pentalocular com muitos óvulos, com estilete terminando em um estigma pentalobular, com papilas por toda a superfície. A média do comprimento dos estiletos e da altura das anteras nas flores brevistilas foi de 14,6 mm e 18 mm, respectivamente, enquanto que nas flores longistilas foi de 19,6 mm e 14,8 mm, respectivamente (tabela 3). Através da análise estatística, pôde-se verificar que a relação entre o comprimento do estilete das flores longistilas e a altura das anteras das flores brevistilas foi significativamente diferente ( $U = 84$ ;  $g. l. = 1$ ;  $P < 0,05$ ), enquanto que não foi observada diferença significativa em relação ao comprimento do estilete das flores brevistilas e a altura das anteras das flores longistilas.

A abertura das flores tem início por volta das 5:00 h, com a distensão lenta dos lobos da corola, ocasião em que as anteras encontram-se deiscentes e os lóbulos do estigma um pouco unidos, porém já receptivos. Por volta das 6:00 h as flores já estão completamente abertas, com os lobos da corola reflexos. O nectário, em forma de disco, localiza-se no ápice do ovário (figura 1). A produção de néctar é contínua, ocorrendo desde a fase de pré-antese até as 16:00 h, com o volume total acumulado durante o dia de ca. 20  $\mu$ l e concentração em torno de 24 %, para ambos os morfos florais. O murchamento das flores ocorre durante a noite e a queda se dá no começo da manhã do dia

seguinte à antese, permanecendo na inflorescência apenas as sépalas envolvendo o ovário. Foi verificada uma maior produção de néctar na primeira parte da manhã, com a diminuição do volume no decorrer do dia, tendo o mesmo acontecido com a concentração de açúcares, em flores brevistilas e longistilas (figura 2).

Os resultados dos testes de polinização manual mostram que houve sucesso na formação de frutos apenas nos cruzamentos intermorfos e que o percentual de frutos formados em condições naturais foi de 70% e 50% em morfos brevistílicos e longistílicos, respectivamente (tabela 4). A análise do crescimento do tubo polínico mostra que nos testes de autopolinização manual, tanto nas flores brevistilas quanto nas flores longistilas, a reação de incompatibilidade ocorre no estigma, entre 12 e 24 horas após a polinização (figuras 3 e 4). Nos cruzamentos intermorfos em que as flores longistilas foram doadoras de pólen, verificou-se que os tubos polínicos penetraram no ovário com 12 horas (figura 5) mas, quando as flores doadoras de pólen foram as brevistilas foi verificado que os tubos polínicos alcançaram o ovário entre 12 e 24 horas (figura 6). A penetração dos tubos nos óvulos, tanto das flores longistilas quanto das brevistilas, foi observada entre 24 e 36 horas após a polinização (figuras 7 e 10). No cruzamento entre flores de indivíduos longistílicos, de agrupamentos distintos, verificou-se que os tubos polínicos cresceram até, aproximadamente, a metade do estilete, sendo interrompidos 12 horas depois da polinização, com a formação de “plugs” de calose (figura 11). Os cruzamentos entre flores brevistilas, tanto para verificação de formação de frutos, quanto para análise do crescimento do tubo polínico, não puderam ser feitos devido ao corte de um dos agrupamentos durante os experimentos.

As flores de *S. cinerea* foram visitadas por abelhas, borboletas, mariposas diurnas, moscas e beija-flores (tabela 5). As visitas às flores iniciavam, pelos beija-flores, entre 5:00 h e 5:30 h, período em que ainda estão abrindo, mas já produzindo néctar. *Phaethornis ruber* foi observado visitando (figura 12), desde a abertura das flores até o final do dia (16:00 h) quando não havia mais néctar, durante todo ano. O beija-flor visitava as flores longistílicas e brevistílicas em seqüência, sendo a deposição do pólen em locais distintos do bico, para os dois morfos florais. O outro beija-flor, *Amazilia* sp., foi

observado visitando apenas flores de um dos agrupamentos longistílicos. Durante todo o período de observação, este beija-flor ficava pousado em um galho próximo às flores longistilas, demonstrando agressividade ao expulsar outros beija-flores da área.

As espécies de moscas foram observadas pilhando néctar, acumulado no tubo de flores longistilas localizadas por baixo da folhagem e próximas ao solo, entre 9:00 e 11:30 h, durante o pico de floração.

As borboletas *Heliconius* sp. (figura 13) e as mariposas diurnas *Urbanus proteus* e *Calpodetes ethlius* foram observadas apenas na época de máxima produção de flores, as quais apresentaram o mesmo comportamento na coleta de néctar, em ambos os morfos florais, começando as visitas por volta das 8:00 h e com menor frequência em torno de 11:30 h. Em vôo lento pousavam nos lobos da corola e ao introduzirem a espirotromba, tocavam o estigma e as anteras.

Sete espécies de abelhas foram observadas nas flores de *S. cinerea*, sendo *Exaerete smaragdina* (figura 14) uma das mais frequentes, começando a coleta de néctar por volta das 8:30 h em flores abertas no mesmo agrupamento ou no vizinho, visitando, portanto, os dois morfos florais e fazendo o contato com as estruturas reprodutivas das flores com a língua. Indivíduos de *Euglossa cordata* foram vistos, muito frequentemente, entre 9:00 e 13:00 h (figura 15), coletando néctar de flores brevistilas e longistilas conectando as estruturas reprodutivas, sendo considerados polinizadores. Os indivíduos de *Eulaema nigrita* e *Melipona scutellaris* foram observados raras vezes, coletando sempre néctar, da mesma maneira e no mesmo período do dia que *Euglossa cordata*, sendo vistos em flores de ambos os morfos florais. *Epicharis* cf. *fasciata* foi observada, também, visitando flores de ambos os morfos florais, principalmente no período entre 9:00 e 13:00 h. Durante a coleta de néctar nas flores longistilas, pousando nos lobos da corola, as abelhas introduziam a língua no tubo floral e o contato com a superfície estigmática era feito com o aparelho bucal, região do clipeo, labro e mandíbulas, enquanto que nesse mesmo local ficavam aderidos os grãos de pólen das flores brevistilas. *Xylocopa suspecta* (figura 16) e *Pseudoaugochloropsis* sp. (figura 17), coletavam néctar por fora do tubo, na base da corola, sendo observadas durante todo o ano. *Trigona fulviventris*

coletava apenas pólen nas flores brevistilas, no começo da manhã, entre 6:30 e 8:00 h. Ao pousar nos lobos da corola, com as pernas anteriores, coletava pólen e, ainda na flor, com o auxílio das pernas medianas, transferia para as pernas posteriores.

### Discussão

Os indivíduos de *Sabicea cinerea* produzem flores durante o ano todo, apresentando padrão de floração do tipo contínuo (Newstrom et al. 1994), com um pico na estação de baixa pluviosidade e escassez de flores na estação chuvosa. Outras espécies de Rubiaceae apresentam este padrão contínuo de floração como *Cephaelis tomentosa*, *Hamelia patens* (Newstrom et al. 1994) e *Manettia luteo-rubra* (Passos & Sazima 1995).

Os agrupamentos brevistílicos e longistílicos de *Sabicea cinerea* ocorreram na razão de 1:1, entretanto, a área ocupada pelos indivíduos longistílicos foi maior, indicando a ocorrência de anisopleitia ao nível individual. Segundo Ganders (1979), dois fatores podem influenciar as espécies distílicas no aumento, em proporções desiguais, de um dos morfos florais: a produção de novos indivíduos através da reprodução vegetativa, relatada aqui para *S. cinerea*, ou por haver a formação de frutos e sementes decorrentes de flores autopolinizadas. A variação interpopulacional na razão dos morfos, com predominância de indivíduos longistílicos foi descrita para *Palicourea petiolaris* na Venezuela (Sobrevila et al. 1983), onde essa variação ocorreu devido a presença de auto-compatibilidade para a espécie, não sendo registrado reprodução vegetativa.

A heterostilia do tipo distílica é reportada, por vários autores, para inúmeras espécies da família Rubiaceae, com o relato deste polimorfismo para o gênero *Sabicea* por Vuilleumier (1967), que indica duas espécies, e por Ganders (1979) que cita apenas o gênero. As flores de *S. cinerea* apresentaram diferenças morfométricas que são encontradas na maioria das espécies heterostílicas tais como flores brevistilas possuindo maior comprimento e grãos de pólen com maior diâmetro, em comparação com as flores longistilas. A diferença no comprimento das flores foi observada em

*Palicourea fendleri* e *P. petiolaris* (Sobrevila et al. 1983), *Guettarda scabra* (Richards & Koptur 1993), *Manettia luteo-rubra* (Passos & Sazima 1995), *Gaertnera vaginata* (Paillet & Thompson 1997) e *Palicourea padifolia* (Ree 1997; Contreras & Ornelas 1999). Com relação a diferenças no diâmetro dos grãos de pólen entre os morfos florais, Jung-Mendaçolli & Melhem (1995) estudaram espécies de nove gêneros de Rubiaceae e verificaram que, de uma forma geral, as flores brevistilas apresentaram grãos maiores. Estas diferenças morfométricas entre os grãos de pólen de flores distílicas foram justificadas por Darwin (1877 *apud* Dulberger 1992), como sendo necessárias para que houvesse um maior armazenamento de reservas, nos grãos de flores brevistilas, para o crescimento do tubo polínico nos longos estiletos das flores longistilas, sendo, porém, questionado por Ganders (1979).

A produção de grãos de pólen, geralmente, é maior nas flores longistilas e, segundo Ganders (1979), essa diferença existe como uma forma de compensar o fluxo assimétrico de pólen entre as formas florais, dado que o estigma de flores brevistilas, estando dentro do tubo da corola, estaria menos exposto, havendo necessidade das flores longistilas produzirem maior quantidade de grãos. As flores de *S. cinerea*, entretanto, produziram grãos de pólen em quantidade equivalente, podendo esse fato ocorrer em algumas espécies heterostílicas (Dulberger 1992).

Espécies distílicas apresentam hercogamia recíproca quando os comprimentos dos estiletos e filetes se equivalem nos morfos opostos (Vuilleumier 1967; Ganders 1979; Barrett 1992). Entretanto, existem espécies em que essa equivalência não é exata, como foi o caso para *S. cinerea*, que apresentou diferença significativa entre o comprimento do estilete das flores longistilas e a altura das anteras das flores brevistilas. Apesar das flores brevistilas possuírem o tubo floral maior, com anteras apresentando filetes epipétalos, teoricamente a equivalência com a porção estigmática das flores longistilas deveria ocorrer, mas os resultados indicaram a existência de um dimorfismo mais acentuado no comprimento dos estiletos, com flores longistilas possuindo a região do estigma um pouco superior à altura das anteras das flores brevistilas.

As flores heterostílicas são mencionadas como polinizadas por vários tipos de insetos, principalmente abelhas, mas também por, moscas, mariposas, borboletas, besouros e beija-flores, não havendo registros para morcegos (Ganders 1979). *Sabicea cinerea* apresenta flores que, através da análise das características morfológicas, não foi possível enquadrá-las claramente em nenhum tipo de síndrome floral sugerido por Faegri & Pijl (1979), Endress (1994) ou Proctor et al. (1996), recebendo uma variedade de animais visitantes incluindo algumas espécies de moscas, abelhas, borboletas, mariposas diurnas e beija-flores, que de uma forma geral, visitam flores tubulosas e tem o néctar como recurso primário. Entretanto, a relação entre a concentração de açúcares do néctar e o tipo de polinizador é importante (Percival 1965; Baker 1975) pois, as flores polinizadas por beija-flores geralmente possuem concentração variando em torno de 20 e 24%, diferentemente das flores polinizadas por abelhas, que caracteristicamente apresentam médias de concentração entre 30 e 48% (Proctor et al. 1996).

As flores de *S. cinerea*, em ambos os morfos, produziram néctar com uma média de concentração de açúcares em torno de 24%, apresentando picos de até 27% nas flores longistilas, indicando uma variação relacionada, principalmente, com a polinização por beija-flores. A polinização por beija-flores e/ou outros insetos parece comum e tem sido relatada para várias espécies de Rubiaceae (Bawa & Beach 1983; Sobrevila et al. 1983; Feinsinger & Busby 1987; Passos & Sazima 1995; Riveros et al. 1995; Ree 1997).

O padrão de crescimento dos tubos polínicos de *S. cinerea* foi semelhante ao de outras espécies de Rubiaceae. Em flores brevistilas e longistilas autopolinizadas, os tubos pararam de crescer na superfície estigmática, sendo este mesmo resultado encontrado em espécies de *Faramea* (Bawa & Beach 1983) e em *Luculia gratissima* (Murray 1990). No cruzamento entre flores longistilas de *S. cinerea*, alguns poucos tubos polínicos cresceram até a região mediana do estilete, ocorrendo diminuição do diâmetro e da intensidade da fluorescência, assim como a formação de “plugs” de calose, mas na maioria dos grãos, os tubos pararam de crescer ainda na superfície estigmática. O mesmo resultado, para os cruzamentos entre flores longistilas, foi observado em *Cephaelis elata* e

*Coussarea* sp. (Bawa & Beach 1983) e *Manettia luteo-rubra* (Passos & Sazima 1995). Apesar de não ter havido a verificação do local da reação de incompatibilidade entre flores brevistilas, possivelmente o resultado seria semelhante, não havendo o desenvolvimento dos tubos além do estilete, levando-se em consideração que os tubos pararam de crescer na superfície estigmática de flores brevistilas autopolinizadas. Possivelmente, os tubos polínicos atingiram o ovário das flores brevistilas depois de 12 horas da polinização, devido ao menor comprimento do estilete, o que nas flores longistilas só aconteceu após 24 horas decorridas da polinização.

O local da reação de incompatibilidade, nas espécies heterostílicas, é variável, ocorrendo na superfície estigmática, estilete ou, até mesmo, no ovário, e podendo, nos dois morfos florais, essa reação ocorrer em locais diferentes, sendo o estigma, o local mais comum nas flores brevistilas autopolinizadas (Gibbs 1986, 1990). Em alguns casos, os tubos oriundos de autopolinizações e polinizações intramorfos penetram na base do estilete, entretanto não ocorre a formação de sementes (Barrett & Richards 1990). O sistema de auto-incompatibilidade esporofítico em espécies distílicas, comumente mostra a inibição de tubos polínicos incompatíveis no estigma (Ganders 1979; Bawa & Beach 1983; Gibbs 1990) sendo, esse padrão, observado aqui para *S. cinerea*.

Os resultados dos experimentos para verificação do sistema reprodutivo e do crescimento dos tubos polínicos confirmaram que *S. cinerea* é auto-incompatível, só havendo a formação de frutos através dos cruzamentos intermorfos. De acordo com a classificação de Cruden (1977), o resultado obtido na razão pólen-óvulo indica xenogamia facultativa para a espécie, o que não foi comprovado com os testes de polinizações controladas e pela verificação do crescimento dos tubos polínicos, mostrando xenogamia obrigatória. Os testes de polinizações manuais, em campo, mostraram que o sucesso na formação de frutos, nos cruzamentos intermorfos, foi semelhante em ambos os morfos florais, sugerindo o equilíbrio do sistema heterostílico distílico de *S. cinerea*. Entretanto, nas flores utilizadas como controle, a formação de frutos foi um pouco maior nas brevistilas, podendo este resultado estar relacionado à formação de uma barreira na superfície estigmática das flores longistilas, o que impossibilitaria ou diminuiria a germinação dos grãos de pólen compatíveis. Essa barreira pode ter

sido formada, principalmente, pela maior exposição do estigma das flores longistilas e, possivelmente, devido ao grande número de animais pilhadores observados nesses indivíduos. Como os agrupamentos longistílicos foram maiores, em área, conseqüentemente, o número mais elevado de flores abertas durante o dia contribuiu mais fortemente na atração dos animais em busca de recursos, principalmente o néctar e, dessa forma, podendo ter aumentado a deposição de grãos de pólen incompatíveis na superfície estigmática, promovendo a geitonogamia e “clogging” (*sensu* Webb & Lloyd 1986), diminuindo o percentual de frutos formados naturalmente. Outro fato que pode ser questionado é a rota que alguns animais faziam para coleta de néctar, principalmente o beija-flor *Phaethornis ruber*, o polinizador mais freqüente, que na maioria das vezes visitava primeiro todas as flores de um dos agrupamentos longistílicos e, em seguida, todas as flores brevistílicas próximas, podendo o próprio ter contribuído para a deposição de pólen incompatível nas flores longistilas.

Com relação aos visitantes florais de *S. cinerea*, através das observações de comportamento e freqüência, pode-se dizer que o beija-flor *Phaethornis ruber* foi um dos principais polinizadores, principalmente, por apresentar eficiência no transporte de pólen entre os morfos florais, contactando as estruturas sexuais das flores com regiões distintas do bico, e por ter sido bastante freqüente desde a abertura floral até o final do dia, nos períodos de pico e escassez de flores, ou seja, durante todo ano. A alta freqüência de visitas, durante o dia, do beija-flor *P. ruber*, pode ser atribuído a pequenas quantidades de néctar produzido por flor, levando o animal a visitar muitas flores, várias vezes, no intuito de suprir suas necessidades energéticas. O beija-flor *Amazilia* sp., foi observado apenas em um dos agrupamentos longistílicos, apresentando comportamento territorialista, ficando pousado em um galho próximo e demonstrando agressividade com outros beija-flores que tentavam se aproximar das flores. De acordo com este comportamento, *Amazilia* sp. foi considerado pilhador, uma vez que não foi observado visitando as flores de indivíduos brevistílicos próximos e, possivelmente, promovendo o acúmulo de grãos incompatíveis no estigma das flores longistilas.

As espécies de borboletas e mariposas diurnas, muito freqüentes no pico de floração, possuem um aparelho bucal bastante comprido, facilitando o contato com as anteras e estigmas durante a coleta do



néctar. Possivelmente, o período de visitas às flores de *S. cinerea*, estação seca, logo após o período chuvoso, está relacionado com o ciclo de vida destes animais.

Dentre as espécies de abelhas, destaca-se *Exaerete smaragdina* como a mais freqüente e, juntamente com *Phaethornis ruber*, um importante polinizador, por ter apresentado várias visitas durante o dia, nos dois morfos florais, e pela probóscide, adaptada à coleta de néctar de flores tubulosas, sendo direcionada ao contato com as estruturas sexuais das flores. As outras espécies de abelhas, apesar de apresentarem um aparelho bucal com uma língua comprida, não foram muito freqüentes. De uma forma geral, a maioria dos animais foram observados com maior freqüência no período da manhã, fato que pode estar diretamente relacionado com a produção de néctar, apesar de *Phaethornis ruber* ter visitado as flores até o final da tarde, período em que o volume de néctar, produzido por flor, era menor.

As flores de *S. cinerea* também foram atrativas para um grande número de pilhadores, como as moscas, que aproveitaram o acúmulo do néctar em algumas flores longistilas, e as espécies de abelhas *Xylocopa suspecta* e *Pseudoaugochloropsis* sp. que, também, coletaram néctar, mas por fora do tubo floral através de uma fissura feita pelas mandíbulas. Da mesma maneira, *Trigona fulviventris*, que apenas coletava pólen das flores brevistilas, sendo facilitada pelo posicionamento das anteras no início da abertura do tubo floral.

Diante dos resultados, fica clara a importância polinizadores de *Sabicea cinerea*, principalmente porque esta espécie apresenta um sistema reprodutivo do tipo auto-incompatível, dependendo inteiramente desses animais no fluxo de pólen entre os morfos, garantindo, dessa forma, o sucesso reprodutivo da espécie. Por outro lado, *S. cinerea*, por possuir um padrão de floração contínuo, representa uma importante fonte alimentar durante o ano inteiro para os animais que se alimentam de néctar e de pólen.

### Agradecimentos

À Ariadna Valentina Lopes, pela grande ajuda no campo, em laboratório, na análise do crescimento dos tubos polínicos e, principalmente, com sugestões. À Ana Emília e Reginaldo, pela ajuda na utilização do microscópio de fluorescência. A Oscar Teixeira Basto Jr. e Cleci Neves, pela companhia e ajuda nos trabalhos de campo. À Daniela Zappi, pela identificação de *Sabicea cinerea*. À Marina Machado Adeodato, pela confecção do abstract. A André Santos, pela ajuda nos cálculos estatísticos. À Isa Regina Leite e Ana Virgínia Leite, pela ajuda em laboratório e em campo. Ao CNPq pelo apoio financeiro com a bolsa de Mestrado.

## Referências bibliográficas

- Andersson, W.R. 1973. A morphological hypothesis for the origin of heterostyly in the Rubiaceae. *Taxon* 22:537-542.
- Baker, H.G. 1975. Sugar concentrations in nectars from hummingbird flowers. *Biotropica* 7:37-41.
- Barrett, S.C.H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: Barrett, S.C.H. (ed.). *Evolution and function of heterostyly. Monographs on theoretical and applied genetics.* Springer-Verlag, Berlin. p.1-24.
- Barrett, S.C.H. & Richards, J.H. 1990. Heterostyly in tropical plants. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55:35-61.
- Bawa, K.S. & Beach, J.H. 1983. Self-incompatibility systems in the Rubiaceae of a tropical lowland wet forest. *American Journal of Botany* 70:1281-1288.
- Contreras, P. S. & Ornelas, J. F. 1999. Reproductive conflicts of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) a distylous shrub of a tropical cloud forest in Mexico. *Plant Systematics and Evolution* 219: 225-241.
- Coutinho, R.Q., Lima, M.F., Neto, J.B.S. & Silva, E.P. 1998. Características climáticas, geológicas, geomorfológicas e geotécnicas da Reserva Ecológica de Dois Irmãos. In: Machado, I.C.; Lopes, A.V. & Pôrto, K C. 1998. *Reserva Ecológica de Dois Irmãos: Estudos em um remanescente de Mata Atlântica em área urbana.* SECTMA (Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente) Editora Universitária-UFPE-Recife. p.21-50.
- Cruden, R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31:32-46.
- Dulberger, R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In: S.C.H. Barrett (ed.) *Evolution and function of heterostyly. Monographs on Theoretical and Applied Genetics.* Springer-Verlag, Berlin. p.41-84.

- Endress, P.K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press, Cambridge. 511p.
- Erdtman, G. 1966. Pollen morphology and plant taxonomy-angiosperms. Hafner, New York. 553p.
- Faegri, K. & Pijl, L. 1979. The principles of pollination ecology. London, Pergamon Press. 244p.
- Feinsinger, P. & Busby, W.H. 1987. Pollen carryover: experimental comparisons between morphs of *Palicourea lasiorrachis* (Rubiaceae), a distylous, bird-pollinated, tropical treelet. *Oecologia* 73:231-235.
- Ganders, F.R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17:607-635.
- Gentry, A.H. 1974. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica* 6:64-68.
- Gibbs, P. 1986. Do homomorphic and heteromorphic self-incompatibility systems have the same sporophytic mechanism? *Plant Systematics and Evolution* 154: 285-323.
- Gibbs, P. 1990. Self-incompatibility in flowering plants: a neotropical perspective. *Revista brasileira de Botânica* 13:125-136.
- Grantsau, R. 1989. Os beija-flores do Brasil. 2<sup>a</sup> ed.. Editora Expressão e Cultura, Rio de Janeiro. 233p.
- Hicks, D.J., Wyatt, R. & Meagher, T.R. 1985. Reproductive biology of distylous partridgeberry, *Mitchella repens*. *American Journal of Botany* 72:1503-1514.
- Jung-Mendaçolli, S. & Melhem, T. 1995. Grãos de pólen de espécies heterostílicas de Rubiaceae. *Revista brasileira de Botânica* 18:61-93.
- Keegan, C.R., Voss, R.H. & Bawa, K.S. 1979. Heterostyly in *Mitchella repens* (Rubiaceae). *Rhodora* 81:567-573.
- Kohn, J.R. & Barrett, S.C. 1992. Experimental studies on the functional significance of heterostyly. *Evolution* 46:43-55.
- Lloyd, D.G. 1972. Breeding systems in *Cotula* L. (Compositae, Anthemideae). I. The array of monoclinal and diclinal systems. *New Phytology* 71:1181-1194.

- Mabberley, D.J. 1993. The Plant-Book. A portable dictionary of the higher plants. Cambridge University Press. 4<sup>o</sup> ed. New York. 706p.
- Maêda, J.M. 1985. Manual para uso da câmara de Neubauer para contagem de pólen em espécies florais. Local: UFRRJ, 4p.
- Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in tile style by means of fluorescence. Stain Technology 34:125-128.
- Murray, B.G. 1990. Heterostyly and pollen-tube interactions in *Luculia gratissima* (Rubiaceae). Annals of Botany 65:691-698.
- Newstrom, L.E., Frankie, G.W. & Baker, H.G. 1994. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in Lowland Tropical Rain Forest Trees at La Selva, Costa Rica. Biotropica 26:141-159.
- Pailler, T. & Thompson, J.D. 1997. Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (Rubiaceae) endemic to La Reunion Island. American Journal of Botany 84:315-327.
- Passos, L. & Sazima, M. 1995. Reproductive biology of the distylous *Manettia luteo-rubra* (Rubiaceae). Botanica Acta 108:309-313.
- Percival, M. 1965. Floral Biology. Pergamon Press. London. 243p.
- Proctor, M., Yeo, P. & Lack, A. 1996. The natural history of pollination. Harper Collins Publishers, London. 479p.
- Radford, A.E., Dickinson, W.C., Massey, J.R. & Bell, C.R. 1974. Vascular plant systematics. New York, Harper & Row Publishers. 891p.
- Ree, R.H. 1997. Pollen flow, fecundity, and the adaptive significance of heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). Biotropica 29:298-308.
- Richards, J.H. & Koptur, S. 1993. Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae). American Journal of Botany 80:31-40.

- Riveros, G.M., Barria, O.R. & Humaña, A., 1995. Self-compatibility in distylous *Hedyotis salzmannii* (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 194:1-8.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro. Ed. Nova Fronteira. 912p.
- Sobrevila, C., Ramirez, N. & Enrech, N.X. 1983. Reproductive biology of *Palicourea fendleri* and *Palicourea petiolaris* (Rubiaceae), Heterostyly shrubs of a Tropical Cloud Forest in Venezuela. *Biotropica* 15:161-169.
- Vuilleumier, B.S. 1967. The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. *Evolution* 21:210-226.
- Webb, C.J. & Lloyd, D.G. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in Angiosperms II. Hecogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24:163-178.
- Zeisler, M. 1938. Über die Abgrenzung der eigentlichen Narbenfläche mit Hilfe von Reaktionen. *Beiheft Botanisches Zentralblatt* 58:308-318.

## Legendas das figuras

Figura 1. Esquema das flores de *Sabicea cinerea* em corte longitudinal, tendo sido retirada uma pétala, mostrando flor brevistila (A), flor longistila (B) e esquema da cabeça de *Phaethornis ruber* (C) ilustrando a correlação entre o comprimento dos estiletes e as alturas das anteras com o bico do beija-flor.

Figura 2. Médias do volume (barras) e da concentração de açúcares (linhas) no néctar em flores brevistilas e longistilas (n=20) de *Sabicea cinerea*.

Figuras 3-6. Tubos polínicos em *Sabicea cinerea*. Figuras 3 e 4 – Notar a interrupção do crescimento dos tubos polínicos na superfície estigmática, de flores brevistilas e longistilas, respectivamente, 24 horas após serem autopolinizadas. Figura 5 - Tubos polínicos penetrando no ovário de flor brevistila, após 12 horas de polinização intermorfos. Figura 6 – Detalhe do alto número de tubos polínicos, de grãos de flores brevistilas, penetrando no ovário de flor longistila, depois de 24 horas decorridas da polinização.

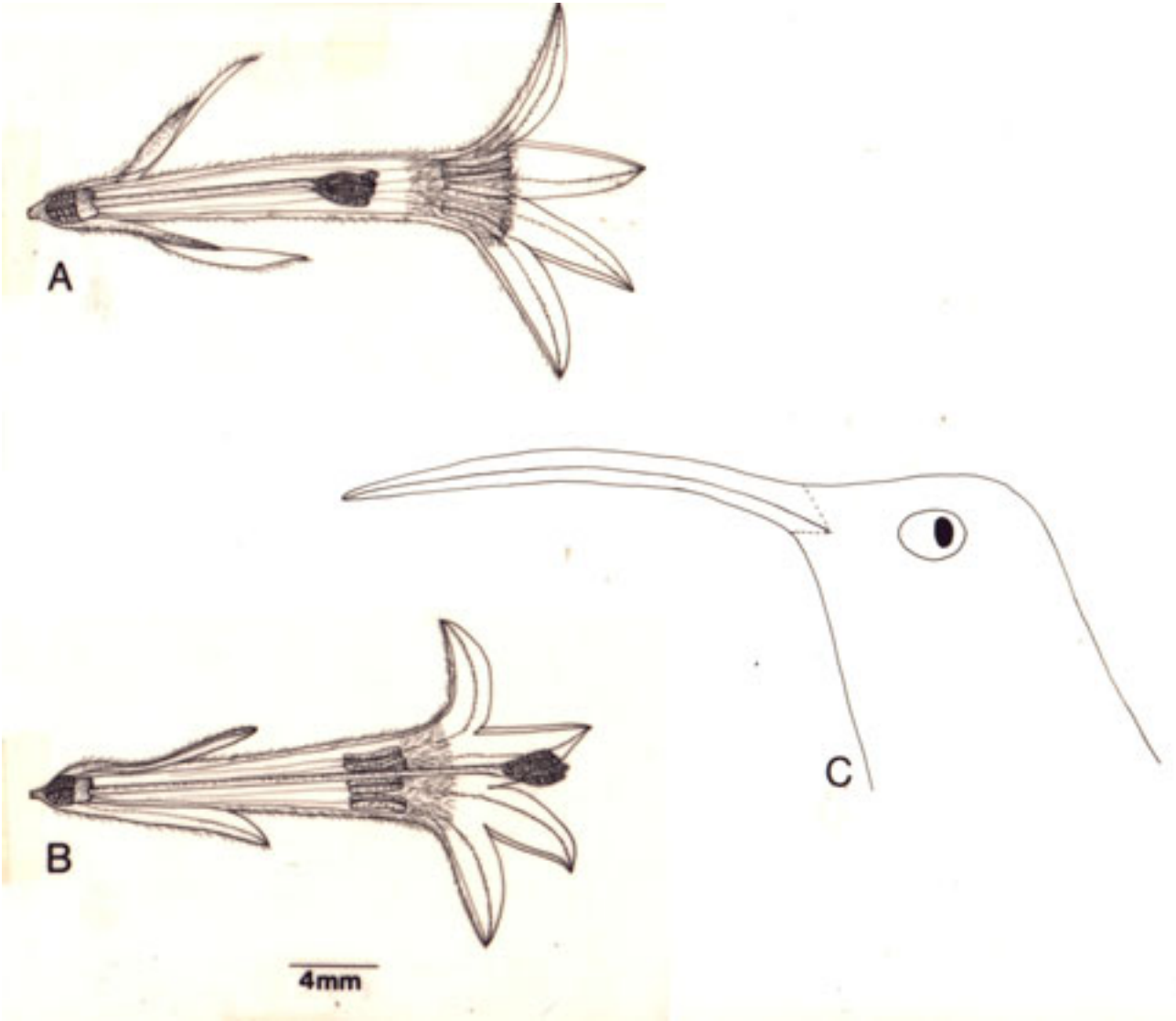
Figuras 7-10. Óvulos após cruzamentos intermorfos. Figura 7 e 8 – Detalhe de óvulos de flores longistilas com tubos polínicos após 36 e 48 horas, respectivamente. Figura 9 – Óvulo de flor brevistila, ainda não fecundado, após 24 horas da polinização. Figura 10 – Detalhe de um óvulo, de flor brevistila, com tubo polínico depois de 36 horas da polinização.

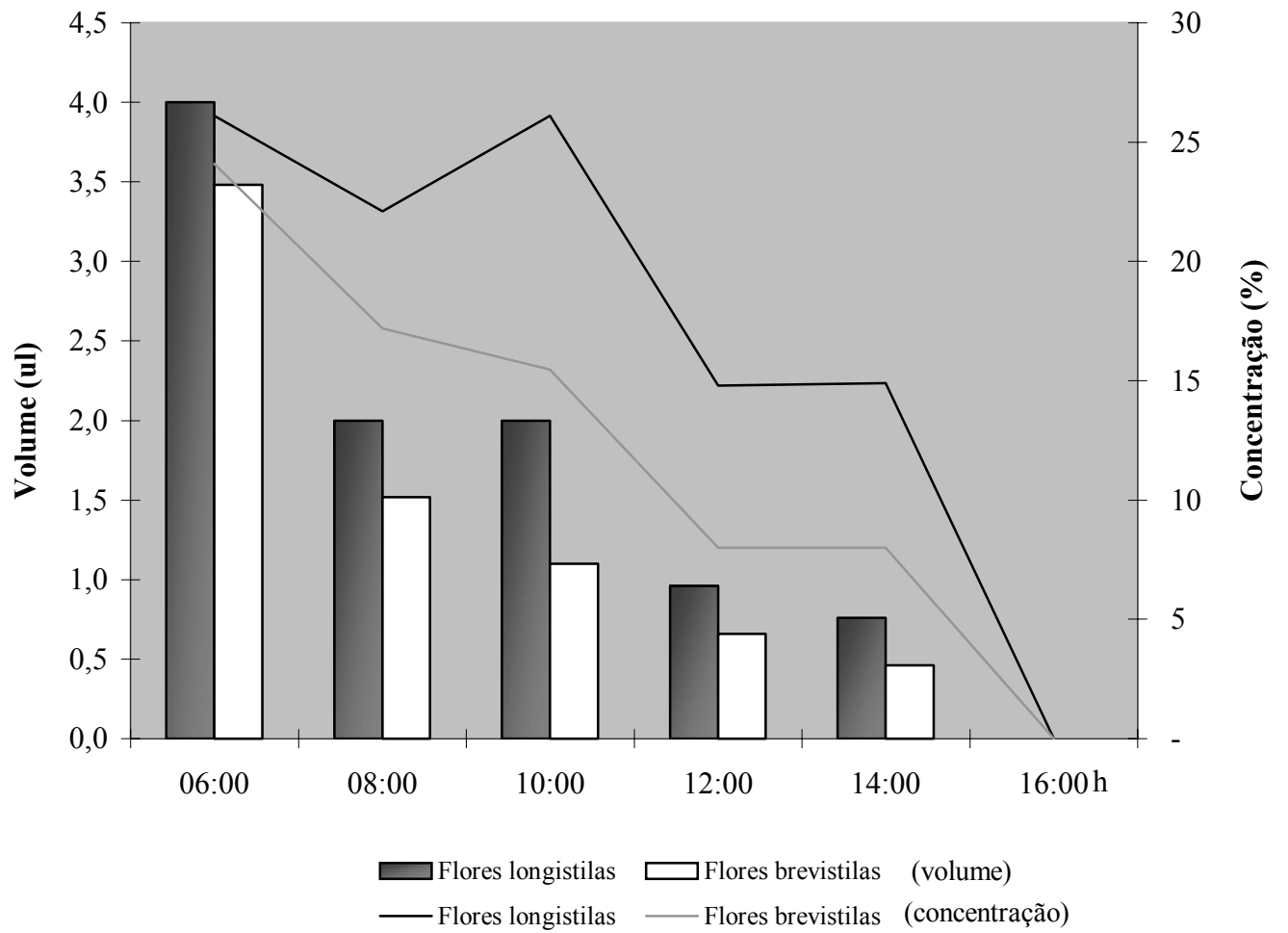
Figura 11. Tubos polínicos oriundos do cruzamento entre flores longistilas, após 12 horas de polinização, sendo interrompidos próximos a metade do estilete, com formação dos “plugs” de calose tanto na região estigmática como no estilete.

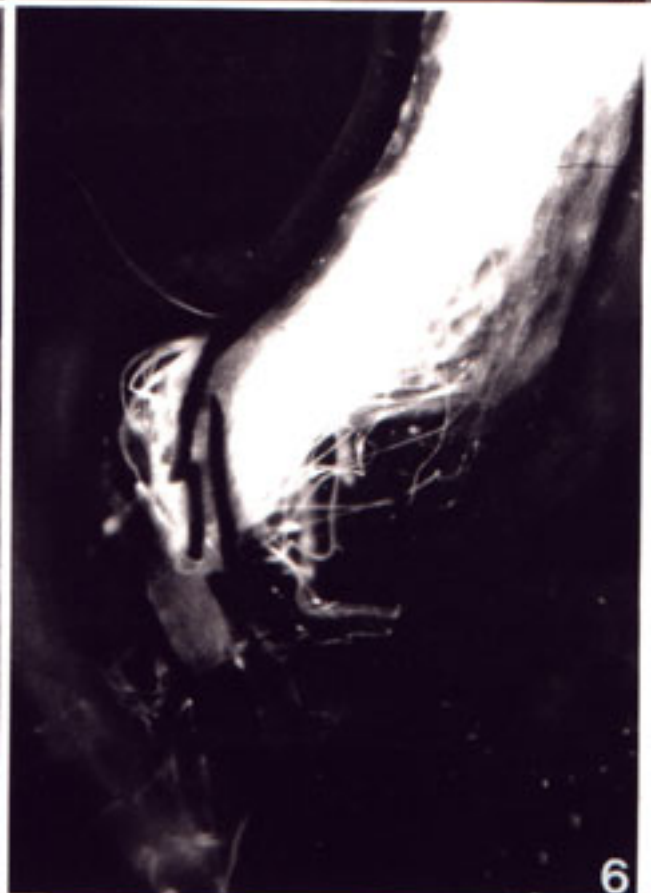
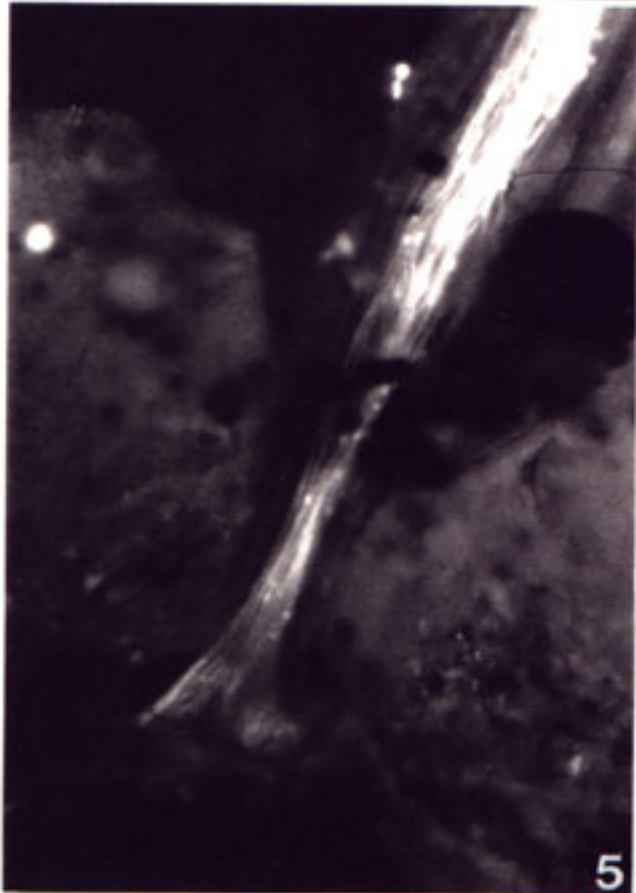
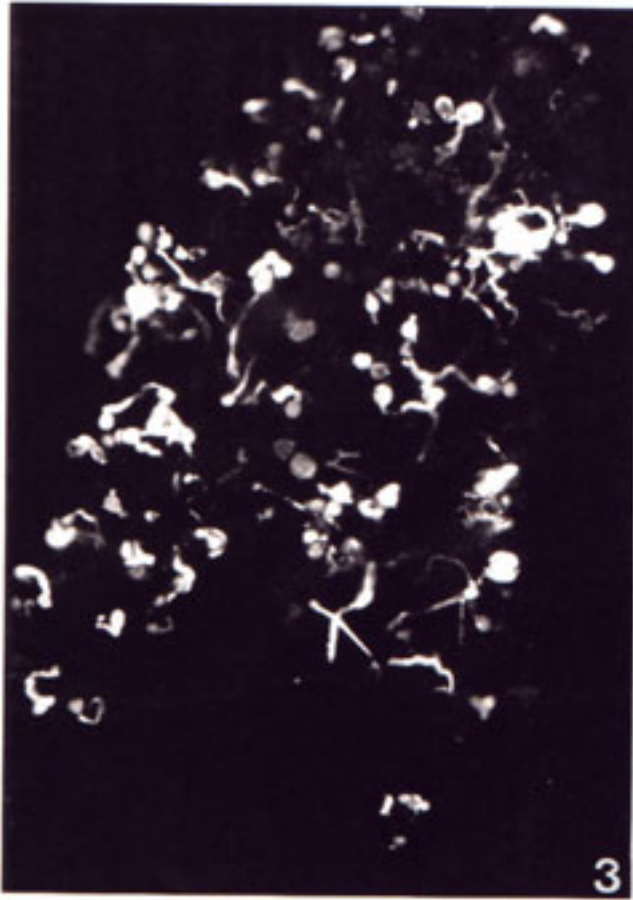
Figuras 12-15. Polinizadores de *Sabicea cinerea* coletando néctar de flores longistilas. *Phaethornis ruber* (12). *Heliconius* sp. (13). *Exaerete smaragdina* (14) introduzindo a língua no tubo floral e *Euglossa cordata* (15).

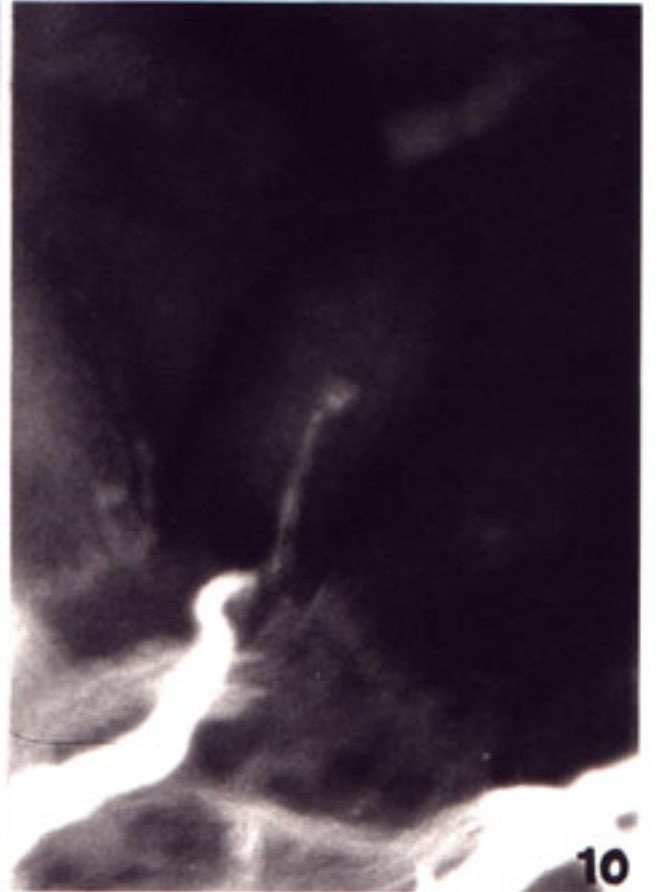
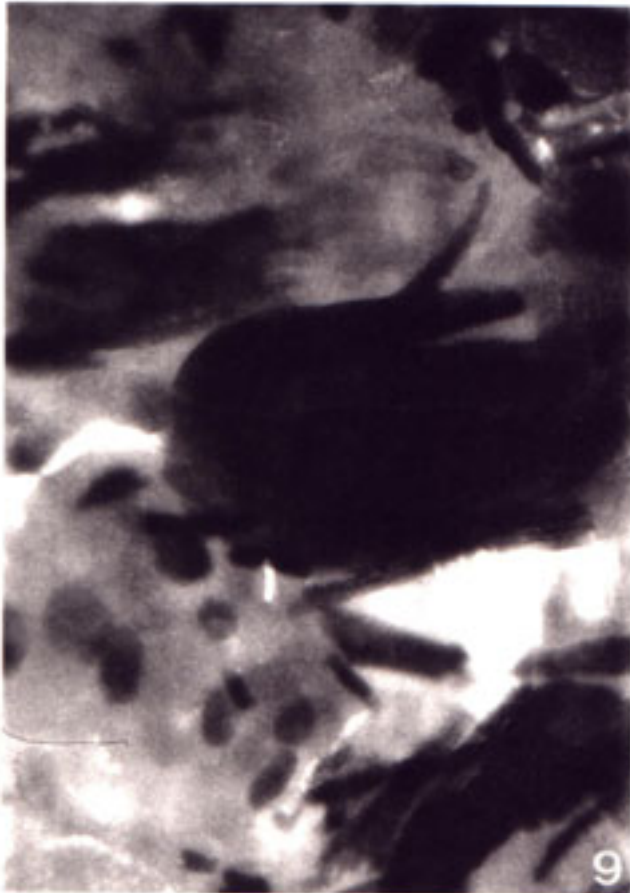
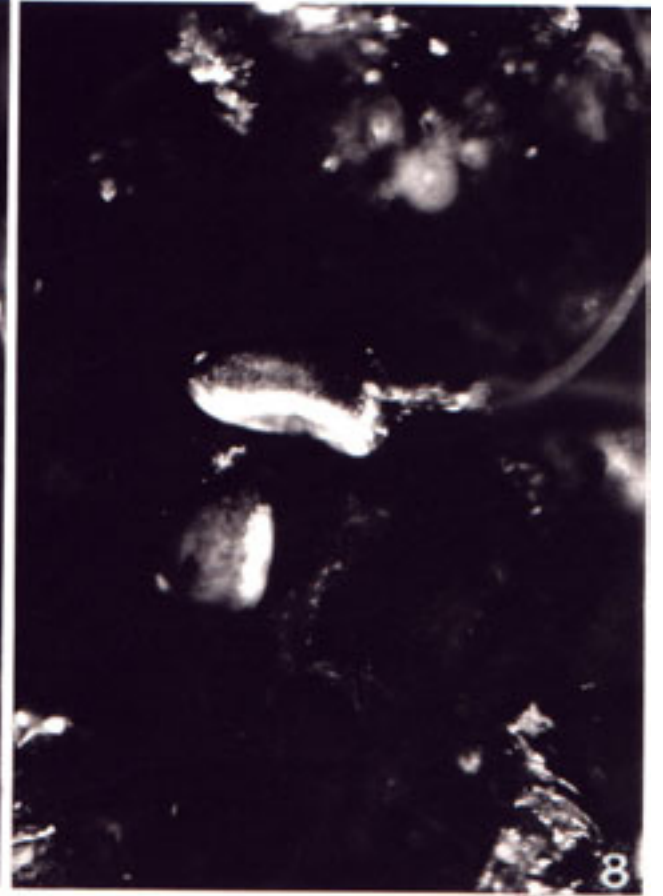
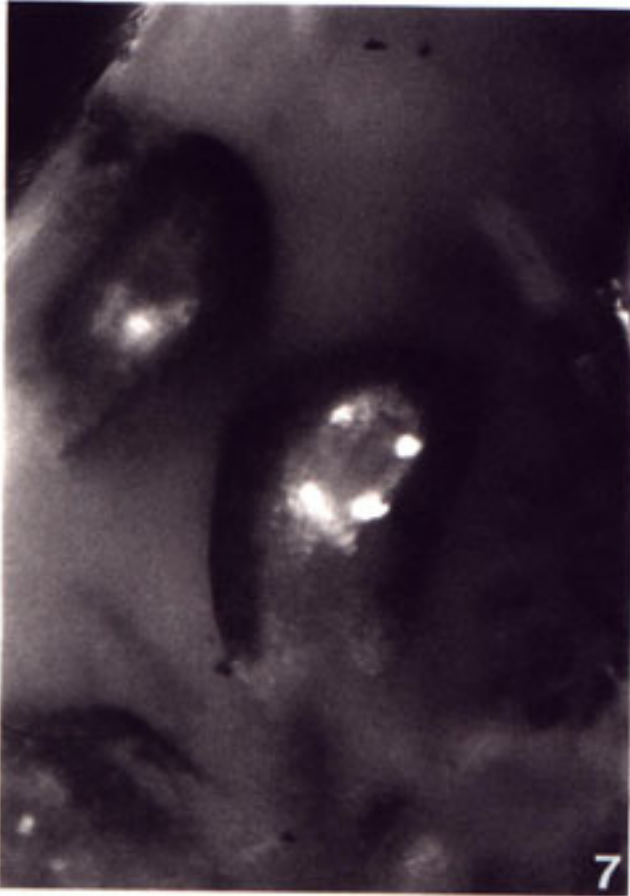
Figuras 16-17. Abelhas pilhadoras de *Sabicea cinerea*, *Xylocopa suspecta* (16) e *Pseudoaugochloropsis* sp. (17), coletando néctar por fora do tubo floral.











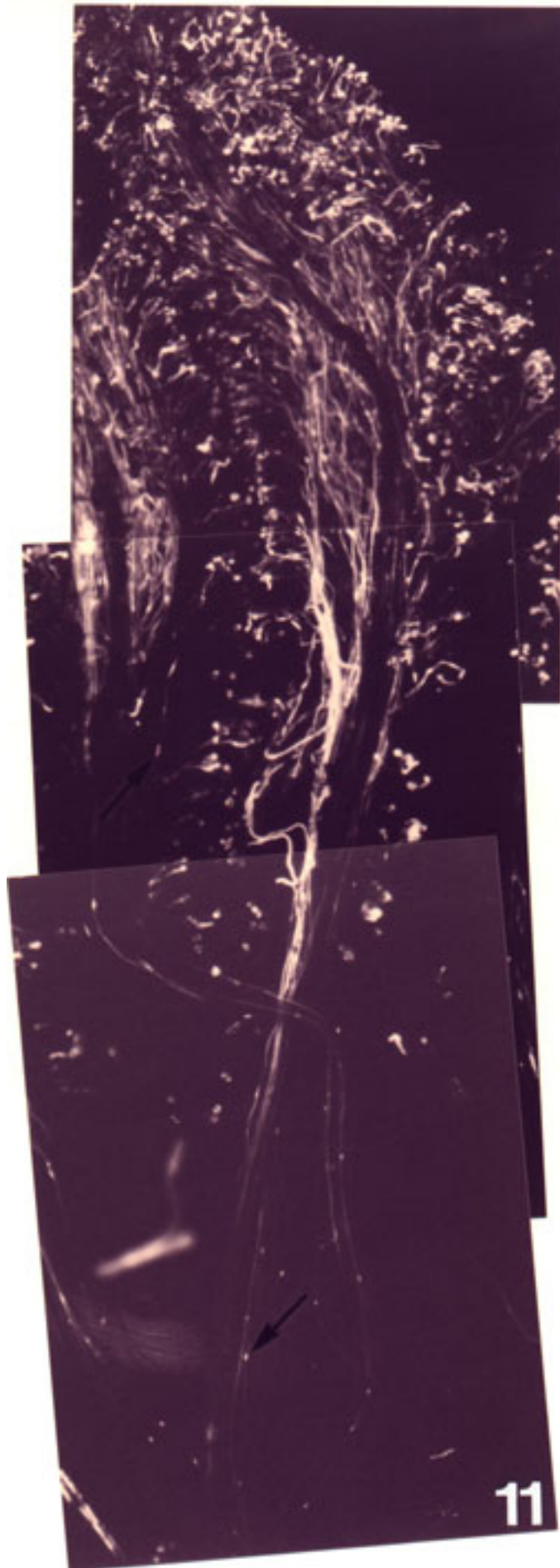






Tabela 1. Número de grãos de pólen por antera (G/A) e por flor (G/F), óvulos por flor (O/F), razão pólen/óvulo (P/O) e viabilidade polínica (V/P) de *Sabicea cinerea*.

Morfos	G/A	G/F	O/F	P/O	VP
Flores brevistilas	26.700	133.500	265,8	502,2	88,6%
Flores longistilas	26.400	132.000	272,5	484,4	89,4%

N=10

Tabela 2. Medidas dos diâmetros polar e equatorial dos grãos de pólen triporados de *Sabicea cinerea*.

Grandezas		
Diâmetro Polar (P):	flores brevistilas	flores longistilas
Faixa de variação ( $\mu\text{m}$ )	27,5-32,5	22,5-27,5
$x \pm Sx$ ( $\mu\text{m}$ )	$30 \pm 0,26$	$25,6 \pm 0,29$
S ( $\mu\text{m}$ )	1,30	1,49
V (%)	4,3	5,8
Diâmetro equatorial (E):		
Faixa de variação ( $\mu\text{m}$ )	$28,7 \pm 32,5$	23,7-30
$x \pm Sx$ ( $\mu\text{m}$ )	$30,4 \pm 0,23$	$27,3 \pm 0,26$
S ( $\mu\text{m}$ )	1,18	1,31
V (%)	3,9	4,8
P/E	0,98	0,93

x-Média aritmética de 25 medidas; Sx - Desvio padrão da média; S - Desvio padrão da amostra  
V - Coeficiente de variabilidade.

Tabela 3. Medidas das características florais, dos dois morfos de *Sabicea cinerea*, indicando a ocorrência de distília.

Atributo floral	Brevistila		Longistila	
	x	SD	x	SD
Comprimento da corola (mm)	27,7	±0,65	24,2	±0,63
Comprimento do estilete (mm)	14,6	±0,27	19,6	±0,34
Altura das anteras (mm)	18,0	±0,37	14,8	±0,44

N=10

Tabela 4. Resultado dos experimentos, em campo, de polinizações manuais e controle, para verificação do sistema reprodutivo em *Sabicea cinerea*.

Tratamentos	Flores (n)	Frutos/Sementes (n)	Sucesso (%)
Autopolinização manual (flores brevistilas)	10	0	0
Autopolinização manual (flores longistilas)	10	0	0
Polinização cruzada			
fl.brevistila* X fl.longistila**	10	5/1380	50
fl.longistila* X fl.brevistila**	11	6/1685	54
Controle			
fl. brevistila	10	7/1641	70
fl. longistila	10	5/1160	50

\* Doador de pólen    \*\* Receptor de pólen



Tabela 5. Visitantes florais de *Sabicea cinerea*, frequência, recompensa coletada e resultado da visita.

Visitantes	Frequência	Recompensa coletada	Resultado da visita
<b>Himenoptera</b>			
<b>Anthophoridae</b>			
<i>Epicharis cf. fasciata</i>	PF	N	PO
<i>Xylocopa (Neoxylocopa) suspecta</i>	MF	N	PI
<b>Apidae</b>			
<i>Euglossa cordata</i>	F	N	PO
<i>Eulaema nigrita</i>	R	N	PO
<i>Exaerete smaragdina</i>	MF	N	PO
<i>Melipona scutellaris</i>	R	N	PO
<i>Trigona fulviventris</i>	MF	P	PI
<b>Halictidae</b>			
<i>Pseudaugochloropsis</i> sp.	MF	N	PI
<b>Diptera</b>			
<b>Syrphidae</b>			
<i>Ornidia obesa</i>	PF	N	PI
Sp2	PF	N	PI
Sp3	PF	N	PI
<b>Lepidoptera</b>			
<b>Hesperiidae</b>			
<i>Calpodes ethlius</i>	MF	N	PO
<i>Urbanus proteus</i>	MF	N	PO
<b>Nymphalidae</b>			
<i>Heliconius</i> sp.	F	N	PO
<b>Aves</b>			
<b>Trochilidae</b>			
<i>Amazilia</i> sp.	MF	N	PI
<i>Phaethornis ruber</i>	MF	N	PO

MF - Muito frequente, PF - Pouco frequente, R – Raro, P - Pólen, N - Néctar, PO - Polinização, PI - Pilhagem

## 6. CONCLUSÕES

O conhecimento da biologia floral e da dinâmica do processo reprodutivo, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, evidenciaram a importância dos animais polinizadores no sucesso reprodutivo e, conseqüentemente, no estabelecimento e na manutenção das populações de *Psychotria barbiflora* DC e *Sabicea cinerea* Aubl.

Tendo como base trabalhos feitos com outras espécies da família Rubiaceae, observou-se uma certa similaridade quando comparado com os resultados obtidos aqui para *Psychotria barbiflora* DC e *Sabicea cinerea* Aubl, principalmente em relação ao sistema reprodutivo, estudado a partir dos resultados das polinizações controladas e do crescimento dos tubos polínicos, pelos quais podemos inferir a auto-incompatibilidade intramorfos para as duas espécies estudadas.

Além disso, os níveis de interações ecológicas, entre as duas espécies de Rubiaceae e os animais visitantes estudados, tornam-se mais acentuados por se tratarem de espécies heterostílicas, com auto-incompatibilidade esporofítica intramorfos. Por outro lado, estas espécies vegetais têm um importante papel no ciclo de vida dos animais visitantes, pois durante o período de floração, oferecem recursos alimentares como néctar e pólen, para cerca de 22 espécies destes, acentuando, dessa forma, a relação mutualística e favorecendo a sustentabilidade dos grupos vegetais e animais.

## 7. RESUMO GERAL

A família Rubiaceae possui cerca de 10.400 espécies distribuídas amplamente por todo o mundo, sendo a maioria encontrada na região dos trópicos. A heterostilia é um polimorfismo genético encontrado em várias famílias de Angiospermas, sendo a família Rubiaceae, a maior em números de espécies heterostílicas. Este trabalho teve como objetivo analisar os aspectos da biologia floral, polinização e o sistema reprodutivo de duas espécies simpátricas de Rubiaceae, *Psychotria barbiflora* DC e *Sabicea cinerea* Aubl., ocorrentes no Parque Estadual de Dois Irmãos, remanescente de Mata Atlântica de Pernambuco. *Psychotria barbiflora* possui hábito subarbustivo, com floração entre abril e julho e frutificação de junho a setembro, apresentando flores distílicas reunidas em inflorescências terminais, pendentes e envoltas por brácteas que, durante a floração apresentam coloração esverdeada, tornando-se arroxeadas na frutificação. A antese das flores inicia a partir das 4:30h, estando abertas às 5:00h e em senescência por volta das 12:00h. Os polinizadores foram abelhas do gênero *Trigona*, que começam as visitas por volta das 6:00h, coletando néctar e pólen, nas flores brevistilas e longistilas, e uma espécie de Scoliidae que coleta apenas néctar, nos dois morfos florais. O volume de néctar foi ca. 0,45 e 0,30 $\mu$ l e a concentração de açúcares, aproximadamente, 22 e 24%, nas flores brevistilas e longistilas, respectivamente. Com relação à morfologia, as flores apresentaram diferenças quanto ao diâmetro dos grãos de pólen e produção por flor, sendo maiores nas flores brevistilas. *Sabicea cinerea* é uma liana perene com flores sendo produzidas por todo ano, com um pico na estação seca (setembro a fevereiro), apresentando flores morfologicamente distílicas e tubulosas. O processo de antese teve início por volta das 5:00h, horário em que o nectário já está produzindo néctar até, aproximadamente, às 16:00h, sendo o volume e a concentração média diária de 8,0 $\mu$ l e 24%, respectivamente, em ambos os morfos florais. As diferenças morfológicas entre os tipos florais ocorreram apenas no tamanho da corola e dos grãos de pólen, sendo maiores nas flores brevistilas. Os visitantes florais foram duas espécies de beija-flores, *Phaethornis ruber*, como um dos principais polinizadores, e *Amazilia* sp. apenas pilhando. Também foram observadas abelhas das famílias Anthophoridae, Apidae e Halictidae, além de borboletas Nymphalidae, mariposas Hesperidae e moscas da família Syrphidae. De acordo com os resultados dos testes de polinizações manuais e do crescimento do tubo polínico pode-se verificar que tanto *P. barbiflora* quanto *S. cinerea* apresentaram auto-incompatibilidade esporofítica havendo a formação de frutos apenas pelos cruzamentos intermorfos. Devido ao sistema reprodutivo xenógamo, associado a heterostilia, vale ressaltar a importância dos polinizadores na reprodução sexuada das duas espécies estudadas.

## 8. ABSTRACT

Observations on the floral biology, pollination and the reproductive system of two sympatric species of Rubiaceae, *Psychotria barbiflora* DC and *Sabicea cinerea* Aubl. were carried out from May/1998 to December/2000. The study was undertaken in the Dois Irmãos State Park, a residual area of Atlantic forest in Pernambuco (8°7'30"S e 34° 52'30"WG). *Psychotria barbiflora* is a subshrubby species, with flowering period from April to July and fruiting during June to September. The flowers are distylous, presented in terminal, pendant inflorescences. The anthesis begins around 4.30 p.m., and the flowers wither at about 12.00 p.m. The pollinators were bees of the genus *Trigona*, which collected nectar and pollen in both short and long-styled flowers, and a species of Scoliidae, that only collected nectar, again in the two floral morphs. The nectar volume was ca. 0,45 and 0,30µl and the sugar concentration, approximately, 22 and 24%, in the short- and long-styled flowers, respectively. The flowers presented differences in the diameter and number of pollen grains such that pollen of the short-styled flowers was larger than that of the long-styled. *Sabicea cinerea* is a perennial vine which produces flowers along the whole year, with a peak in the dry season (September to February). The flowers are distylous and tubular. The anthesis process begins at about 5.00 a.m. until, approximately, 16.00 p.m. The volume and the daily mean sugar concentration of the nectar is 8,0µl and 24%, respectively, in both floral morphs. The size of the corolla and that of pollen grains presented differences, both being larger in the short-styled flowers. The floral visitors were two species of hummingbirds, *Phaethornis ruber*, as the main pollinator, and *Amazilia* sp., a nectar thief. Bees of the families Anthophoridae, Apidae and Halictidae, and also Nymphalidae butterflies, Hesperidae moths and flies of the Syrphidae family were also observed. The results of the manual pollination treatments and that of growth of the pollen tubes indicate that *P. barbiflora* and *S. cinerea* both present heteromorphic st. which set fruit only in the intermorph crosses. Due to the xenogamous reproductive system, associated to the heterostyly, the presence and frequency of the pollinators is very important to the sexual reproduction of these two studied species.

## **9. ANEXOS**

**NORMAS GERAIS PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS NA ACTA BOTANICA BRASÍLICA**

1. A Acta Botanica Brasílica (Acta bot. bras.) publica em Português, Espanhol e Inglês, artigos originais, comunicações curtas e resumos de dissertações e teses em Botânica.

2. Os artigos devem ser concisos, em **4 vias, com até 30 laudas**, seqüencialmente numeradas, incluindo ilustrações e tabelas (usar letra Times New Roman, tamanho 12, espaço entre linhas 1,5; imprimir em papel tamanho carta, com todas as margens ajustadas em 1,5cm). A critério da Comissão Editorial, mediante entendimentos prévios, artigos mais longos poderão ser aceitos, sendo que o excedente será custeado pelo(s) autor(es).

3. Palavras em latim no título ou no texto, como por exemplo: *in vivo*, *in vitro*, *in loco*, *et al.*, devem estar em itálico.

4. O título deve ser escrito em caixa alta e centralizado.

5. Os nomes dos autores devem ser escritos em caixa alta e baixa, alinhados à direita, com números sobrescritos que indicarão, em rodapé, a filiação Institucional e/ou fonte financiadora do trabalho (bolsas, auxílios, etc.).

6. A estrutura do trabalho deve, sempre que possível, obedecer à seguinte seqüência:

- **RESUMO** e **ABSTRACT** (em caixa alta e negrito) - texto corrido, sem referências bibliográficas, em um único parágrafo e com ca. de 200 palavras. Deve ser precedido pelo título do artigo em Português, entre parênteses. Ao final do resumo, citar até cinco palavras-chave. A mesma regra se aplica ao Abstract em Inglês ou Espanhol.

- **Introdução** (em caixa alta e baixa, negrito, deslocado para a esquerda): deve conter uma visão clara e concisa de: a) conhecimentos atuais no campo específico do assunto tratado; b) problemas científicos que levaram o(s) autor(es) a desenvolver o trabalho; c) objetivos.

- **Material e métodos** (em caixa alta e baixa, negrito, deslocado para a esquerda): deve conter descrições breves, suficientes à repetição do trabalho; técnicas já publicadas devem ser apenas citadas e não descritas.

- **Resultados e discussão** (em caixa alta e baixa, negrito, deslocado para a esquerda): podem ser acompanhados de tabelas e de figuras (gráficos, fotografias, desenhos, mapas e pranchas), estritamente necessárias à compreensão do texto. Dependendo da estrutura do trabalho, resultados e discussão poderão ser apresentados em um mesmo item ou em itens separados.

As figuras devem ser todas numeradas seqüencialmente, com algarismos arábicos, colocados no lado inferior direito; as escalas, sempre que possível, devem se situar à esquerda da figura. As tabelas devem ser seqüencialmente numeradas, em arábico com numeração independente das figuras.

Tanto as figuras como as tabelas devem ser apresentadas em folhas separadas ao final do texto (originais e 3 cópias). Para garantir a boa qualidade de impressão, as figuras não devem ultrapassar duas vezes a área útil da revista que é de 15 x 21cm. As ilustrações devem ser apresentadas em tinta nanquim, sobre papel vegetal ou cartolina.

As fotografias devem estar em papel brilhante e em branco e preto. **Fotografias coloridas poderão ser aceitas a critério da Comissão Editorial e se o(s) autor(es) arcarem com os custos de impressão.**

As figuras e as tabelas devem ser referidas no texto em caixa alta e baixa, de forma abreviada e sem plural (Fig. e Tab.). Todas as figuras e tabelas apresentadas devem, obrigatoriamente, ter chamada no texto.

As siglas e abreviaturas, quando utilizadas pela primeira vez, devem ser precedidas do seu significado por extenso. Ex.: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Usar unidades de medida apenas de modo abreviado. Ex.: 11cm; 2,4µm.

Escrever por extenso os números de um a dez (não os maiores), a menos que seja medida ou venha em combinação com

outros números. Ex.: quatro árvores; 6,0mm; 1,0-4,0µm; 125 exsicatas.

Em trabalhos taxonômicos o material botânico examinado deve ser selecionado de maneira a citarem-se apenas aqueles representativos do táxon em questão e na seguinte ordem:

**PAÍS, Estado:** Município, data, fenologia, *coletor(es) n. do(s) coletor(es)* (sigla do herbário).

Ex.: **BRASIL, São Paulo:** Santo André, 03/XI/1997, fl. fr., *Milanez 435* (SP).

No caso de mais de três coletores, citar o primeiro seguido de *et al.* Ex.: Silva *et al.*

(atentar para o que deve ser grafado em CAIXA ALTA, Caixa Alta e Baixa, caixa baixa, **negrito**, *itálico*).

Chaves de identificação devem ser, preferencialmente, indentadas. Nomes de autores de táxons não devem aparecer. Os táxons da chave, se tratados no texto, devem ser numerados seguindo a ordem alfabética. Ex.:

1. Plantas terrestres

2. Folhas orbiculares, mais de 10cm diâm .... **4. *S. orbicularis***

2. Folhas sagitadas, menos de 8cm compr. .... **6. *S. sagittalis***

1. Plantas aquáticas

3. Nervuras paralelas

4. Flores brancas ..... **1. *S. albicans***

4. Flores roxas ..... **5. *S. purpurea***

3. Nervuras furcadas

5. Frutos oblongos ..... **2. *S. furcata***

5. Frutos esféricos ..... **3. *S. nanuzae***

O tratamento taxonômico no texto deve reservar o itálico e negrito simultâneos apenas para os nomes de táxons válidos. Basônimo e sinônimo aparecem apenas em itálico. Autores de nomes científicos devem ser citados de forma abreviada, de acordo com índice taxonômico do grupo em pauta (Brummit & Powell 1992 para Fanerógamas). Ex.:

1. *Sepulveda albicans* L., Sp. pl. 2: 25. 1753.

*Pertencia albicans* Sw., Fl. bras. 4: 37, t. 23, f. 5. 1870.

*Cabralea zeleyensis* Anisio, Hoehnea 33(2): 65. 1995.

Fig. 1-12.

Subdivisões dentro de Material e métodos ou de Resultados devem ser escritas em caixa alta e baixa, seguida de um traço e o texto segue a mesma linha. Ex.: Área de estudo - localiza-se ...

- Resultados e discussão deve incluir as conclusões.

- **Agradecimentos** (em caixa alta e baixa, negrito, deslocado para a esquerda): devem ser sucintos.

- **Referências bibliográficas**

- ao longo do texto: seguir esquema autor, data. Ex.:

Silva (1997), Silva & Santos (1997), Silva *et al.* (1997) ou Silva (1993; 1995), Santos (1995; 1997) ou (Silva 1975; Santos 1996; Oliveira 1997).

- ao final do artigo: em caixa alta e baixa, deslocado para a esquerda; seguir ordem alfabética e cronológica de autor(es); nomes dos periódicos e títulos de livros devem ser grafados por extenso e em negrito. Exemplos:

Santos, J. 1995. Estudos anatômicos em Juncaceae. Pp. 5-22.

In: **Anais do XXVIII Congresso Nacional de Botânica**. Aracaju 1992. HUCITEC Ed. V. I. São Paulo.

Santos, J.; Silva, A. & Oliveira, B. 1995. Notas palinológicas. *Amaranthaceae*. **Hoehnea** 33(2): 38-45.

Silva, A. 1996. **A família Urticaceae no Estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Paraná, Londrina.

Silva, A. 1997. O gênero *Pipoca* L. no Brasil. **Acta Botanica Brasílica** 2(1): 25-43.

Silva, A. & Santos, J. 1997. Rubiaceae. Pp. 27-55. In: F. C. Hoehne (Ed.). **Flora Brasílica**. Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, São Paulo.

Não serão aceitas como referências bibliográficas Resumos de Congressos. Citações de Dissertações e Teses devem ser evitadas.

Para maiores detalhes consulte os últimos fascículos da revista ou o "link" na internet [www.botanica.org.br](http://www.botanica.org.br).



## REVISTA BRASILEIRA DE BOTÂNICA

A *Revista Brasileira de Botânica* (RBB), periódico editado pela Sociedade Botânica de São Paulo (SBSP), publica artigos originais de pesquisa completos e notas científicas em Ciências Vegetais, em Português, Espanhol ou Inglês, sendo recomendado este último.

Os manuscritos completos (incluindo figuras e tabelas), em quatro cópias, devem ser enviados ao Editor Responsável da Revista Brasileira de Botânica, Caixa Postal 57088, 04093-970 São Paulo, SP, Brasil.

A aceitação dos trabalhos depende de decisão do Corpo Editorial. Os artigos devem conter as informações estritamente necessárias para a sua compreensão. Artigos que excedam 15 páginas impressas (cerca de 30 páginas digitadas, incluindo figuras e tabelas), poderão ser publicados, a critério do Corpo Editorial, **devendo o(s) autor(es) cobrir o custo adicional de sua publicação**. Igualmente, **fotografias coloridas** poderão ser publicadas, a critério do Corpo Editorial, **devendo o(s) autor(es) cobrir os custos de publicação das mesmas**. As notas científicas deverão apresentar contribuição científica ou metodológica original e não poderão exceder 10 páginas digitadas, incluindo até 3 ilustrações (figuras ou tabelas). Notas científicas seguirão as mesmas normas de publicação dos artigos completos. Serão fornecidas, gratuitamente, 20 separatas dos trabalhos nos quais pelo menos um dos autores seja sócio quite da SBSP. Para os demais casos, as separatas poderão ser solicitadas por ocasião da aceitação do trabalho e fornecidas mediante pagamento.

## Instruções aos autores

Preparar todo o manuscrito com numeração sequencial das páginas utilizando: Word for Windows versão 6.0 ou superior; papel A4, todas as margens com 2 cm; fonte Times New Roman, tamanho 12 e espaçamento duplo. Deixar apenas um espaço entre as palavras e não hifenizá-las. Usar tabulação (tecla Tab) apenas no início de parágrafos. Não usar negrito ou sublinhado. Usar itálico apenas para nomes científicos ou palavras e expressões em latim.

## Formato do manuscrito

**Primeira página** - Título: conciso e informativo (em negrito e apenas com as iniciais maiúsculas); nome completo do(s) autor(es) (em maiúsculas); filiação e endereço completo como nota de rodapé, indicando autor para correspondência e respectivo e-mail; título resumido. Auxílios, bolsas recebidas e números de processos, quando for o caso, devem ser referidos no item Agradecimentos.

**Segunda página** - ABSTRACT (incluir título do trabalho em inglês), RESUMO (incluir título do trabalho em português), Key words (até 5, em inglês). O Abstract e o Resumo devem conter no máximo 250 palavras.

**Texto** - Iniciar em nova página colocando seqüencialmente: Introdução, Material e métodos, Resultados/ Discussão, Agradecimentos e Referências bibliográficas. Citar cada figura e tabela no texto em ordem numérica crescente. Colocar as citações bibliográficas de acordo com os exemplos: Smith (1960) / (Smith 1960); Smith (1960, 1973); Smith (1960a, b); Smith & Gomez (1979) / (Smith & Gomez 1979); Smith et al. (1990) / (Smith et al. 1990); (Smith 1989, Liu & Barros 1993, Araujo et al. 1996, Sanches 1997).

Em trabalhos taxonômicos, detalhar as citações de material botânico, incluindo ordenadamente: local e data de coleta, nome e número do coletor e sigla do herbário, conforme os modelos a seguir: BRASIL: MATO GROSSO: Xavantina, s.d., H.S. Irwin et al. (HB 3689). SÃO PAULO: Amparo, 23-XII-1942, J.R. Kublowitz & E.R. Menezes 290 (SP); Matão, ao longo da BR 156, 8-VI-1961, G. Eiten et al. 2215 (SP, US).

Abreviaturas de nomes de autores de táxons devem seguir Brummit & Powell (1992).

Citar referências a resultados não publicados ou trabalhos submetidos da seguinte forma: (S.E. Sanchez, dados não publicados)

Citar números e unidades da seguinte forma:

- Escrever números até nove por extenso, a menos que sejam seguidos de unidades ou indiquem numeração de figuras ou tabelas.

- Utilizar, para número decimal, vírgula nos artigos em português ou espanhol (10,5 m) ou ponto nos artigos escritos em inglês (10.5 m).

- Separar as unidades dos valores por um espaço (exceto para porcentagens ou para graus, minutos e segundos de coordenadas geográficas); utilizar abreviações sempre que possível.

- Utilizar, para unidades compostas, exponenciação e não barras (Ex.: mg.dia<sup>-1</sup> ao invés de mg/dia, µmol.min<sup>-1</sup> ao invés de µmol/min).

**Não inserir espaços** para mudar de linha, caso a unidade não caiba na mesma linha.

**Não inserir figuras no arquivo do texto.**

**Referências bibliográficas** - Indicar ao lado da referência, a lápis, a(s) página(s) onde a mesma foi citada.

Adotar o formato apresentado nos seguintes exemplos:

ZAR, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, New Jersey.

YEN, A.C. & OLMSTEAD, R.G. 2000. Phylogenetic analysis of *Carex* (Cyperaceae): generic and subgeneric relationships based on chloroplast DNA. In *Monocots: Systematics and Evolution* (K.L. Wilson & D.A. Morrison, eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, p.602-609.

BENTHAM, G. 1862. Leguminosae. Dalbergiae. In *Florea brasiliensis* (C.F.P. Martius & A.G. Eichler, eds.). F. Fleischer, Lipsiae, v.15, pars 1, p.1-349.

DÖBEREINER, J. 1998. Função da fixação de nitrogênio em plantas não leguminosas e sua importância no ecossistema brasileiro. In *Anais do IV Simpósio de Ecossistemas Brasileiros* (S. Watanabe, coord.). ACIESP, São Paulo, v.3, p.1-6.

FARRAR, J.F., POLLOCK, C.J. & GALLAGHER, J.A. 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science* 154:1-11.

Citar dissertações ou teses **somente em caráter excepcional**, quando as informações nelas contidas forem imprescindíveis para o entendimento do trabalho e quando não estiverem publicadas na forma de artigos científicos. Nesse caso, utilizar o seguinte formato:

SANO, P.T. 1999. *Revisão de Actinocrophalus* (Koern.) Sano - Eriocaulaceae. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

**Não citar resumos de congressos.**

## Tabelas

Usar os recursos de criação e formatação de tabela do Word for Windows. Evitar abreviações (exceto para unidades).

Colocar cada tabela em página separada e o título na parte superior conforme exemplo:

Tabela 1. Produção de flavonóides totais e fenóis totais (% de massa seca) em folhas de *Pyrostegia venusta*.

Não inserir linhas verticais; usar linhas horizontais apenas para destacar o cabeçalho e para fechar a tabela.

Em tabelas que ocupem mais de uma página, acrescentar na(s) página(s) seguinte(s) "(cont.)" no início de cada nova página, à esquerda.

## Figuras

Submeter **um conjunto de figuras originais** em preto e branco e **três cópias** com alta resolução.

Enviar ilustrações (pranchas com fotos ou desenhos, gráficos, mapas, esquemas) no **tamanho máximo de 23,0 x 17,5 cm**, incluindo-se, aí, o espaço necessário para a legenda. Não serão aceitas figuras que ultrapassem o tamanho estabelecido ou que apresentem qualidade gráfica ruim. Figuras digitalizadas podem ser enviadas, desde que possuam nitidez e que sejam impressas em papel fotográfico ou "glossy paper".

Gráficos ou outras figuras que possam ser publicados em uma única coluna (8,5 cm) serão reduzidos; atentar, portanto, para o tamanho de números ou letras, para que continuem visíveis após a redução. Tipo e tamanho da fonte, tanto na legenda quanto no gráfico, deverão ser os mesmos utilizados no texto. Gráficos e figuras confeccionados em planilhas eletrônicas **devem vir acompanhados do arquivo com a planilha original**.

Colocar cada figura em página separada e o conjunto de legendas das figuras, seqüencialmente, em outra(s) página(s).

Utilizar escala de barras para indicar tamanho. A escala, sempre que possível, deve vir à esquerda da figura; o canto inferior direito deve ser reservado para o número da(s) figura(s).

Detalhes para a elaboração do manuscrito são encontrados nas últimas páginas de cada fascículo. Sempre que houver dúvida consulte o fascículo mais recente da RBB.

O trabalho somente receberá data definitiva de aceite após aprovação pelo Corpo Editorial, tanto em relação ao mérito científico quanto ao formato gráfico. A versão final do trabalho, aceita para publicação, deverá ser enviada em uma via impressa e em disquete, devidamente identificados.