

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

ANA PALMIRA SILVA

**BIOLOGIA REPRODUTIVA E POLINIZAÇÃO
DE *Palicourea rigida* H.B.K. (RUBIACEAE).**

Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Brasília

1995

Trabalho realizado no Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação da Professora Mariluz Araujo Granja e Barros, com o auxílio de bolsa de pós-graduação da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES a partir do mês de setembro de 1994.

Aprovado por:

Mariluz A. G. e Barros

Presidente da Banca Examinadora

Linda Styer Caldas

Membro da Banca Examinadora

Paulo Eugênio A. M. de Oliveira

Membro da Banca Examinadora

“Aventurar-se é arriscar-se à ansiedade, mas não
aventurar-se é o mesmo que perder a si próprio”

Sören Kierkegaard
(1813-1855)

Aos meus filhotes
Thaís e Fábio

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas e instituições que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho, em especial à(s)/ao (s):

Fundação Educacional do Distrito Federal pela concessão do afastamento para estudos.

Profa. Mariluz A. G. e Barros pela orientação, apoio e compreensão durante a realização do trabalho.

Professores do Departamento de Botânica, Linda S. Caldas, Carolyn B. Proença, Dulce Rocha, George Eiten, Irene da C. A. Mendes, Terezinha I. Paviani, e aos colegas do Mestrado pelo apoio e sugestões.

Mercedes Bustamante, professora do Departamento de Ecologia, pelas análises estatísticas, sugestões, incentivo e principalmente pelas “tertúlias”.

Carlos Klink, professor do Departamento de Ecologia, pela leitura do trabalho e sugestões apresentadas como suplente da Banca Examinadora.

Wilma R.C. Ribeiro, professora do Departamento de Fitopatologia, pelo isolamento e identificação dos fungos patogênicos

Elliot Kitajima e Sonia Nair Bão professores do Laboratório de Microscopia Eletrônica pelo apoio na utilização dos equipamentos do laboratório.

Marcelo Bagno e Anamaria A. Ferreira pela identificação dos beija-flores e “apoio técnico”.

Kiniti Kitayama, professor do Departamento de Zoologia, pela indicação da área, sugestões, fornecimento de alfinetes e identificação de besouros, baratas e moscas.

Ivone R. D. Rocha e Anthony Raw, professores do Dep. de Zoologia, pela identificação das vespas e abelhas, respectivamente.

Marcio Naves e Helena Castanheiras, professores do Departamento de Ecologia, pela identificação das formigas.

Amábilio J. A. de Camargo, do CPAC - EMBRAPA pela identificação de lepidópteros e hemípteros.

Marcelo Ianhez, pela amizade e pelas pranchas. Ao Luciano Bianchetti e Dulce Rocha por terminarem os desenhos que a limitação drástica do seu tempo fez com que ficassem incompletos.

Daniel Louzada pela ajuda no campo, pelas fotos (Figuras 15c, 16a, 25b, c e d, 27b, 28c, 29a) e pela “força”.

Cássia Munhoz, Dulce Rocha e Fernanda Bucci pela amizade, sugestões e pelo apoio moral e físico (no campo e na cidade).

Cecília pela adaptação dos mapas e ao Clerton pela “viração”.

Sergio O. Macedo, mestrando em Ecologia, pelas informações e discussões sobre *Palicourea officinalis*.

Tânia Sanaiotti, do “Royal Botanic Garden” em Edinburg, Escócia, pelas informações e sugestões sobre germinação e dispersão.

Funcionários do Departamento de Botânica: Aída, Elias, Enilton, Eronildes, José Ayres, José do Carmo, Helena, D. Maria, pelo carinho e apoio constantes. Ao Fausto, pela revelação da fotos preto e branco.

RESUMO

O sistema reprodutivo de *Palicourea rigida* H.B.K. (Rubiaceae) foi investigado em uma população reprodutiva em área de campo cerrado na Fazenda Água Limpa (UnB), de agosto de 1993 a abril de 1995. A espécie é distílica, com plantas longistiladas e brevistiladas em uma mesma população na proporção 2:1. Suas flores apresentam dimorfismo no comprimento dos estiletos e estames, na forma e tamanho do estigma e no diâmetro dos grãos de pólen. As flores longistiladas possuem estiletos e grãos de pólen maiores, estigma e filetes menores que os de brevistiladas.

Testes experimentais de polinização evidenciaram que *P. rigida* possui incompatibilidade heteromórfica. Estigmas e estiletos foram observados ao microscópio de fluorescência em diferentes intervalos de tempo após polinizações legítimas, ilegítimas e auto-polinizações. Ocorre variação intermórfica do sítio de rejeição ao pólen incompatível. Registrou-se inibição ao crescimento de tubos polínicos após cruzamentos ilegítimos e auto-polinizações na região estigmática de flores brevistiladas e na porção estilar basal de longistiladas.

Estudos de fenologia, biologia floral e polinização de *P. rigida* também foram realizados. A espécie tem floração sazonal com dois ciclos anuais de diferentes intensidades, o principal deles ocorrendo durante a estação chuvosa. Suas inflorescências são tirsóideas e terminais. As flores são tubulares, de base gibosa. Possuem um disco nectarífero acima do ovário e nectários circunflorais na superfície externa da corola em forma de tricomas glandulares. A atração visual é exercida indistintamente pelas morfais especialmente por meio da variabilidade cromática das inflorescências, que se estende das hastes até os verticilos florais internos.

P. rigida é polinizada principalmente por *Colibri serrirostris*, beija-flor com comportamento fortemente territorial. Os polinizadores adicionais são outras espécies de beija-flor, abelhas e lepidópteros.

Palavras-chave: heterostilia, incompatibilidade, ornitofilia.

SUMMARY

The breeding system of *Palicourea rigida* H.B.K. (Rubiaceae) was investigated in a reproductive population, from August 1993 to April 1995, in open savanna, “campo cerrado” (Fazenda Água Limpa - Field Station of the University of Brasília, Brazil). The taxon is heterostyled with pin and thrum flowers occurring in separate plants. The two floral morphs occur in a 2:1 ratio. Floral dimorphism was observed in style and stamen length, stigma shape and size, and pollen grain diameter. In pin flowers the style and pollen grains are bigger and the stigma and filaments are smaller than in thrum flowers.

Experimental tests showed that *P. rigida* presents heteromorphic incompatibility. Styles and stigmas were observed at different time intervals following legitimate, illegitimate and auto-pollination. Fluorescence microscopy indicated intermorphic variation in the location of the incompatibility barrier, which was at the base of the style of pin flowers and in the stigma for thrum flowers.

Phenological, floral biology and pollination studies were also carried out. *P. rigida* flowers twice a year. The main flowering period is in the rainy season. The inflorescences were thyrsoid and terminal. The visual attraction is colour variation presented by inflorescences and flowers. The flowers were tubular and gibbous. A nectariferous disk surrounds the base of the style, above the ovary. Circum-floral (secreting hairs) nectaries occur in the external epidermis of the corolla

P. rigida is mainly pollinated by *Colibri serrirostris*, a territorial hummingbird. The additional pollinators were other hummingbird species, bees, moths and butterflies.

Key words: heterostyly, incompatibility, ornithophily.

ÍNDICE

	Páginas
1. Introdução.....	01
2. Revisão bibliográfica sobre heterostilia.....	04
2.1. Introdução.....	04
2.2. Caracterização.....	04
2.3. Auto-incompatibilidade e genética da heterostilia.....	05
2.4. Função e evolução da heterostilia.....	07
2.5. Quebra evolutiva da heterostilia.....	09
3. Material e métodos.....	11
3.1. Área de estudo.....	11
3.1.1. Sistema subterrâneo.....	12
3.2. Eventos fenológicos.....	12
3.3. Biologia floral.....	16
3.4. Biologia reprodutiva.....	18
3.4.1. Testes experimentais.....	18
3.4.2. Esforço reprodutivo.....	20
3.5. Estudo dos visitantes florais.....	21
3.6. Análises estatísticas.....	21
4. Resultados.....	22
4.1. Ocorrência e fenologia.....	22
4.1.1. Sistema subterrâneo.....	27
4.2. Biologia floral.....	30
4.2.1. Morfologia de inflorescências e flores.....	30
4.2.2. Eventos florais.....	36
4.2.3. Pólen.....	38
4.3. Biologia reprodutiva.....	41
4.3.1. Testes experimentais.....	41
4.3.2. Esforço reprodutivo.....	45
4.4. Visitantes florais.....	51

5. Discussão.....	61
5.1. Ocorrência e fenologia.....	61
5.1.1. Sistema subterrâneo.....	62
5.2. Biologia floral.....	63
5.2.1. Eventos florais e polinização.....	63
5.2.1.1. Pólen.....	66
5.3. Biologia reprodutiva.....	69
5.3.1. Sistema reprodutivo.....	69
5.3.2. Avaliação do esforço reprodutivo.....	72
5.3.2.1. Frutos, sementes e dispersão.....	73
6. Conclusões.....	75
7. Referências bibliográficas.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Assunto	Página
Figura 1 - Região administrativa de Brasília (mapa).....		13
Figura 2 - Fazenda Água Limpa - UnB (mapa).....		14
Figura 3 - Precipitação total - 1993 a 1995 (Gráfico).....		15
Figura 4 - Temperatura média do ar - 1993 a 1995 (Gráfico).....		15
Figura 5 - Umidade relativa do ar - 1993 a 1995 (Gráfico).....		15
Figura 6 - Horas de insolação - 1993 a 1995 (Gráfico).....		15
Figura 7 - Floração de plantas marcadas na área A (Gráfico).....		23
Figura 8 - Levantamento de material depositado nos herbários do DF (Gráfico)...		23
Figura 9 - Número de flores abertas por dia por inflorescência (Gráfico).....		24
Figura 10 - Localização das plantas marcadas na área A (Mapeamento).....		25
Figura 11 - Registros após a passagem de fogo na área A (Fotos).....		26
Figura 12 - Sistema subterrâneo (Fotos).....		28
Figura 13 - Brotamento a partir do sistema subterrâneo (Fotos).....		29
Figura 14 - Morfologia de flores e inflorescências (Desenhos).....		31
Figura 15 - Morfologia de inflorescências (Fotos).....		32
Figura 16 - Morfologia floral (Fotos).....		34
Figura 17 - Tricomas glandulares da corola (Microfotografias).....		35
Figura 18 - Grãos de pólen (Microfotografias).....		39
Figura 19 - Tubos polínicos em meio nutritivo (Microfotografias).....		40
Figura 20 - Estigma e estilete de flores longistiladas polinizados.....		43
(Microfotografias)		
Figura 21 - Estigma e estilete de flores brevistiladas polinizados.....		44
(Microfotografias)		
Figura 22 - Morfologia de frutos (Fotos).....		47
Figura 23 - Morfologia de frutos, sementes e embrião (Desenhos).....		48
Figura 24 - Frutos partenocárpicos (Fotos).....		49
Figura 25 - <i>Colibri serrisrostris</i> (Fotos).....		52
Figura 26 - <i>C. serrirostris</i> , <i>Thalurania furcata</i> e <i>Chrysolampis mosquitus</i> (Fotos)		53
Figura 27 - <i>Bombus morio</i> e <i>Apis mellifera</i> (Fotos).....		56
Figura 28 - <i>Aellopus fadus</i> e outros lepidópteros (Fotos).....		58
Figura 29 - Coletores de exsudatos e predadores de flores e frutos (Fotos).....		60

ÍNDICE DE TABELAS

Número	Assunto	Página
Tabela 1	- Floração na área A.....	24
Tabela 2	- Caracterização dos períodos de floração.....	24
Tabela 3	- Coloração da corola.....	36
Tabela 4	- Medidas dos verticilos florais.....	36
Tabela 5	- Produção de néctar.....	37
Tabela 6	- Razão pólen-óvulo.....	38
Tabela 7	- Formação de tubos polínicos em meio nutritivo.....	40
Tabela 8	- Testes experimentais de polinização.....	42
Tabela 9	- Tamanho de sementes.....	46
Tabela 10	- Informações sobre duas plantas longistiladas da área A.....	50
Tabela 11	- Visitantes de inflorescências e flores.....	54

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Palicourea* Aubl. pertence à tribo Psychotrieae da família Rubiaceae, estando taxonomicamente relacionado ao gênero *Psychotria* L., que contém o maior número de espécies desta tribo. Existem três centros de riqueza de espécies de *Palicourea*, todos na América do Sul, sendo um deles a região do Planalto Centro Sul do Brasil (Taylor 1989). De acordo com o material examinado dos herbários UB, HEPH, IBGE e CENARGEN, verifica-se no Distrito Federal a ocorrência de cinco espécies: *P. coriacea* (Cham) Schum; *P. crocea* (SW) R & S; *P. marcgravii* St. Hil; *P. officinalis* Mart [=*P. squarrosa* (Muell Arg.) Standl] e *P. rigida* Kunth.

Palicourea rigida ocorre por toda a zona tropical da América do Sul (Steyermark 1974), sendo comum nos cerrados e campos da região Centro Oeste e nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Bahia. É conhecida por suas folhas coriáceas que produzem som característico ao serem tocadas, o que lhe valeu as denominações "bate-caixa" e "gritadeira", além de "douradinha, douradinha do campo, douradão, Dom Bernardo, batedeira, congonha do gentio, erva gritadeira", entre outros (Conceição 1980, Balbach 1981, Pio Correa 1984, Grandi *et al.* 1989). *P. rigida* é uma espécie arbustiva de até 3m de altura, com ramos quadrangulares, suberosos, acinzentados e glabros. Apresenta inflorescências terminais, densas (tirsoídeas), com flores zigomorfas, produtoras de néctar, que é acumulado na base gibosa da corola (Robbrecht 1988). Segundo Oliveira (1991), a antese é diurna, com duração de 24 horas e as flores são visitadas principalmente por *Amazilia fimbriata*, beija-flor que demonstra territorialidade de forrageamento, e por grandes abelhas, especialmente *Oxaea flavescens*.

P. rigida é uma planta bastante conhecida na medicina popular e seu uso terapêutico está registrado em publicações sobre plantas medicinais. O decocto de suas folhas e hastes é utilizado em doenças do sistema urinário como cistite, oligúria, disúria, anúria (Conceição 1980, Balbach 1981, Barros 1982, Pio Correa 1984); em Minas Gerais, principalmente, suas folhas e raízes são usadas como anti-sifilítico e as folhas e casca do caule como depurativo e para inflamações do ovário (Grandi *et al.* 1989). Certas características peculiares à esta planta, como a arquitetura de seu caule, ramos e folhas e a presença conspícua de suas flores, evidenciam um potencial para que seja indicada como ornamental.

A escolha de *P. rigida* para este estudo se deve a um interesse biológico especial, pelo fato de apresentar heteromorfismo floral (heterostilia) do tipo distília, ou seja, dois morfotipos florais: um com estilete exserto e estames insertos (longistilada) e outro com estilete inserto e estames exsertos (brevistilada). O nível do estigma em flores brevistiladas corresponde ao nível das anteras nas longistiladas e vice-versa. Além disso, a distília é caracterizada secundariamente por outras diferenças morfológicas encontradas entre flores brevistiladas e longistiladas. Para *P. rigida* foram investigados: tamanho da corola; forma e tamanho do estigma e das papilas estigmáticas; tamanho das anteras e a quantidade, tamanho, forma, cor, escultura da exina e conteúdo dos grãos de pólen.

A biologia floral e eficiência reprodutiva de *P. rigida* como espécie heterostílica, foi investigada por meio de testes de polinização controlada e metodologia específica desenvolvida a partir dos experimentos de campo, das publicações abrangentes sobre ecologia da polinização e interações planta-animal (Faegri & Van der Pijl 1971, Dafni 1992, Kearns & Inouye 1993) e daquelas que tratam especificamente de plantas do cerrado (Barbosa 1983, Scariot 1987, Noronha & Gottsberger 1980, Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger 1988, Barros 1989, 1990, 1992, Oliveira 1991, Gribel & Hay 1993, Proença & Gibbs 1994, Baumgarten 1994), entre outras.

Considerando a escassez de informações sobre a biologia reprodutiva de plantas do Cerrado e principalmente de plantas heterostílicas, o presente estudo tem como objetivos:

A. Caracterizar a biologia reprodutiva de *Palicourea rigida* e avaliar a eficiência do dimorfismo floral como estratégia de intensificação da xenogamia, investigando se:

- ocorre isopleia entre as morfais brevistiladas e longistiladas, nas populações estudadas.
- a eficácia reprodutiva e a produção de pólen são diferenciadas entre as morfais, resultantes de possível distinção de papéis: maternal (receptoras de pólen) e paternal (doadoras de pólen).
- a auto-fecundação e a fecundação intramórfica são inviáveis, devido a um sistema genético de incompatibilidade.

B. Investigar as inter-relações planta/polinizador/dispersor, para determinar se:

- plantas com maior número de inflorescências e coloração contrastante têm maior eficácia reprodutiva por atraírem maior quantidade de polinizadores.

- a oferta de néctar e a concentração de sacarose apresenta variação intermórfica.
- a dispersão das sementes é zoocórica.

C. Determinar em laboratório o poder germinativo das sementes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE HETEROSTILIA

2.1. Introdução

Heterostilia é um tipo de polimorfismo floral (hercogamia recíproca), geneticamente controlado, onde flores hermafroditas apresentam diferentes comprimentos de estiletos e posicionamento oposto das anteras, podendo ocorrer em condições distílicas, isto é, com flores brevistiladas e longistiladas ou com flores medistiladas além destas, caracterizando a tristilia. Geralmente está associada a um sistema de auto-incompatibilidade dialélico-esporofítico, pelo qual espécies hermafroditas são incapazes de se reproduzirem sexuadamente por auto-polinização. Esta auto-incompatibilidade se deve a uma rejeição determinada geneticamente por um ou dois *loci* com dois alelos (um dominante e um recessivo) e que ocorre ao nível da interação pólen (**n**, mas morfológicamente determinado pela planta mãe - esporófito - **2n**) e estigma (**2n**) (Lewis 1979).

O significado desse heteromorfismo floral começou a ser proposto por Charles Darwin e Friedrich Hildebrand a partir da metade do século XIX (Ornduff 1992). O termo heterostilia foi proposto por Hildebrand em 1867 (Bir Bahadur 1968). Os termos legítimo e ilegítimo passaram a ser usados para cruzamentos intraespecíficos compatíveis (intermórficos) e incompatíveis (intramórficos), respectivamente, a partir da revisão geral sobre o assunto publicada por Darwin em 1877, encontrando-se hoje revisões abrangentes sobre o tema como a de Vuilleumier (1967), Ganders (1979a) e, mais recentemente, Barrett & Richards (1990) e os trabalhos compilados por Barrett (1992). Em um destes, Lloyd & Webb (1992) registram a ocorrência de heterostilia em plantas perenes de 25 famílias de angiospermas, incluídas em 164 gêneros (Ganders 1979a), dos quais a maior parte pertence à família Rubiaceae (91 gêneros, 416 espécies), sendo a tribo Psychotrieae uma das que contém maior número de *taxa* heterostílicas (Bir Bahadur 1968).

2.2. Caracterização

A distilia apresenta duas morfais florais: uma com estilete maior que os estames (longistiladas) e outra com estilete menor que os estames (brevistiladas). A altura do estigma em flores brevistiladas corresponde ao nível das anteras nas longistiladas e vice-versa. Além disso, existem características morfológicas secundárias tais como: corola em geral tubular, que pode apresentar pequenas diferenças de tamanho entre as morfais;

estigmas com diversificação de tamanho, forma e cor, além de variação nas papilas; anteras de diferentes tamanhos que podem produzir grãos de pólen com variações de quantidade, tamanho, forma, cor, escultura da exina e conteúdo amiláceo. A presença e o grau em que estes dimorfismos se manifestam varia conforme a espécie estudada (Baker 1966, Ornduff 1970, 1986, Dulberger 1973, 1992, Opler *et al.* 1975, Sobrevila *et al.* 1983, Olesen 1979, Barros 1989).

A tristilia caracteriza-se pela ocorrência de três formas florais com correspondente variação entre o comprimento de estames e estiletos. As flores longistiladas apresentam o estilete acima das anteras. Estas se distribuem em dois níveis de altura: um equivalente ao estigma das flores brevistiladas (estilete abaixo dos estames longos e intermediários) e outro equivalente ao estigma das flores medistiladas (estilete em nível intermediário aos dos estames). O nível de complexidade do sistema reprodutivo dessas plantas é maior que em plantas distílicas já que duas reações de incompatibilidade são encontradas em um mesmo indivíduo (Weller 1992). A ocorrência de tristilia é rara, tendo sido registrada apenas em espécies das famílias Lythraceae, Oxalidaceae e Pontederiaceae (Eiten 1963, Barrett 1977, Barrett & Wolfe 1985, Barrett & Shore 1987, Pacheco & Coleman 1989, Gibbs 1990, O'Neil 1992).

A ocorrência de indivíduos em espécies tipicamente distílicas, com flores de anteras e estigmas em níveis aproximadamente iguais, foi descrita por Darwin (1877) como homostilia. Esse fenômeno pode ser encontrado em populações distintas ou mistas (Barrett & Shore 1987, Ganders *et al.* 1985), em um gradiente contínuo de diferenciação das formas heterostílicas ou não (Gibbs & Taroda 1983).

2.3. Auto-incompatibilidade e genética da heterostilia

Auto-incompatibilidade é a incapacidade de plantas férteis, hermafroditas, produzirem sementes a partir de autopolinização. A incompatibilidade heteromórfica, na qual diferenças morfológicas florais caracterizam os tipos inter-compatíveis, ocorre em diferentes graus, sendo que algumas espécies apresentam autogamia, desenvolvida provavelmente a partir de situações desfavoráveis à polinização cruzada como ineficiência ou ausência de polinizadores (Lewis 1979). Existem também evidências de quebra do sistema de incompatibilidade, conduzindo à auto-compatibilidade ou à dioiccia, com o surgimento de espécies com indivíduos de sexos separados (Gibbs 1990).

A relação entre heteromorfismo floral e auto-incompatibilidade se deve à ligação entre os *loci* gênicos que os controlam, formando o que é chamado de supergene (Ganders 1979a). No caso da distília, o controle é feito por um *locus* (**S** - com dois alelos), originando plantas brevistilas heterozigotas e longistilas homozigotas recessivas apesar de se verificar o contrário em *Armeria maritima* (Baker 1966) e *Hypericum aegypticum* (Ganders 1979a). A homozigose dominante não ocorre se as plantas heterozigotas forem auto-incompatíveis. Em tristília, dois *loci* (**S**, epistático a **M** - com 2 alelos cada) determinam plantas longistilas duplamente recessivas; brevistilas, heterozigotas para **S** e medistilas, homozigotas recessivas para **S** e com pelo menos um alelo dominante para **M** (Lewis 1979). Para *Oxalis articulata* (Fyfe 1956 *apud* Lewis & Jones 1992) registra-se a morfa longistilada como dominante.

A partir deste sistema dialélico de incompatibilidade heteromórfica (esporofítico), a isopletia (iguais proporções das morfais) é esperada para populações em situação de equilíbrio, podendo não ocorrer em casos de espécies com reprodução vegetativa predominante ou auto-compatibilidade parcial (Ornduff 1979, 1986). Para *Anchusa officinalis*, McKenna (1985) considera que a maior quantidade da morfa longistilada se explica por um maior vigor esporofítico de sementes e plântulas desta morfa, o que propicia maior sucesso no estabelecimento.

A homostília, que apresenta morfais auto-compatíveis com anteras e estigmas na mesma posição, é interpretada como resultante de *crossing-over* no supergene da heterostília (Barrett & Richards 1990). É mais frequente a ocorrência de morfais longi-homostilas, como no gênero *Psychotria* (Hamilton 1990). Plantas homostilas são raramente auto-incompatíveis, o que lhes permite ampla distribuição geográfica e a ocupação de habitats onde os polinizadores são escassos (Ganders 1979a), fato que impede o estabelecimento de seus parentes xenogâmicos exclusivos.

O local da barreira de incompatibilidade apresenta variação inter e intra-específica, podendo ocorrer na superfície do estigma, por inibição do crescimento do tubo polínico, como em todas as morfais de *Linum pubescens* (Dulberger 1973). Esta inibição estigmática também ocorre em morfais brevistiladas de *Erythroxylum* (Barros 1989) e de sete espécies de rubiáceas lenhosas (Bawa & Beach 1983). As morfais longistiladas destas espécies apresentam a reação incompatível ao longo do estilete. Em *Anchusa officinalis*,

espécie distílica, a auto-incompatibilidade é tardia (Schou & Phillip 1983) ou seja, a rejeição ocorre no ovário, impedindo a formação de frutos, o que caracteriza incompatibilidade gametofítica, típica de plantas homomórficas. Para *Cryptantha flava*, Casper (1985) sugere o aborto seletivo de embriões como um mecanismo mantenedor da isopletia em suas populações, já que a espécie é distílica mas auto-compatível, o que também pode justificar o excesso de longistilas produzidas em cruzamentos de *Amsinckia douglasiana* (Casper *et al.* 1988). Na espécie tristílica *Pontederia sagittata* a inibição do tubo polínico depende da combinação entre as morfais em questão, podendo ocorrer no tecido estilar ou no ovário (região da micrópila), sendo pré-zigótica em qualquer caso (Barrett & Richards 1990).

As plantas auto-incompatíveis, em sua maioria, apresentam o sistema homomórfico gametofítico multialélico (Gibbs 1990), considerado vantajoso em relação ao heteromórfico esporofítico por permitir que uma planta possa ser polinizada por qualquer outro indivíduo da população, enquanto que em distílica, metade da população é descartada e em tristílica um terço, já que os cruzamentos ocorrem apenas entre morfais diferentes. No sistema gametofítico o pólen incompatível é rejeitado principalmente no estilete, podendo ocorrer auto-incompatibilidade tardia. Outro sistema de auto-incompatibilidade, o homomórfico esporofítico, é de rara ocorrência apresentando rejeição ao pólen incompatível na superfície do estigma (Gibbs 1990).

2.4. Função e evolução da heterostilia

Darwin (1877) justificou a heterostilia como um mecanismo para promover polinização cruzada mediada por insetos. Assim sendo, grãos de pólen de anteras mais altas e baixas seriam depositados em diferentes partes do corpo dos vetores e transportados para os estigmas da posição equivalente. A este processo Darwin chamou de polinização legítima e às polinizações entre verticilos de mesma altura, de ilegítimas. Ornduff (1970, 1979, 1986) em pesquisas com populações de *Jepsonia parryi*, *Primula vulgaris* e espécies de *Villarsia*, postula que as polinizações legítimas ocorrem ao acaso, não estando vinculadas ao heteromorfismo floral e conseqüente deposição diferencial de pólen pelo polinizador, o que demonstraria não haver vantagem reprodutiva da distílica sobre o monomorfismo floral.

Entretanto, o que se evidencia por meio dos estudos de casos de heterostilia é que as flores longistiladas, que possuem estigmas exsertos, são mais eficientes na captura total de pólen, o que se torna mais evidente quanto maior for a separação espacial entre estigma e anteras (Ganders 1979a). Essa eficiência é relativa, visto que esses estigmas recebem pólen de flores vizinhas (geitonogamia), já que é comum o mesmo polinizador realizar repetidas visitas às flores de uma mesma planta. Apesar disso, verifica-se que, em geral, plantas longistiladas recebem maior número de polinizações legítimas. Isto pode ter levado a seleção natural a lhes conferir uma função feminina (maternal ou receptora de pólen) enquanto plantas brevistiladas (Casper & Charnov 1982, Richards 1986, Barrett & Shore 1987, Monteiro *et al.* 1991, O'Neil 1992) teriam uma função masculina (paternal ou doadora de pólen). Vale registrar que na maioria dos casos estudados, brevistilas produzem grãos de pólen de maior diâmetro e em menor quantidade que longistilas (Ganders 1979b, Ornduff 1979, Barros 1989, Pacheco & Coleman 1989) e também formam menor quantidade de sementes (Ornduff 1986, Richards 1986, O'Neil 1992).

Num esforço para facilitar o entendimento das forças seletivas envolvidas na reprodução de plantas heteromórficas, encontram-se sugestões de modelos matemáticos para questões polêmicas como evolução (Baker 1966, D. Charlesworth & B. Charlesworth 1979) e alocação sexual de recursos (Casper & Charnov 1982, Taylor 1989, Charlesworth & Morgan 1991, Casper 1992). Segundo Dulberger (1992) a falha desses trabalhos está em considerar o polimorfismo floral e incompatibilidade como fenômenos independentes, desconsiderando a premissa que as propriedades polimórficas do pistilo e grãos de pólen participam da fisiologia da incompatibilidade.

As hipóteses para explicar o surgimento da heterostilia e assim entender seu significado adaptativo diferem em alguns pontos, mas em geral são consonantes em relação a uma origem polifilética e evolução convergente e gradual, resultando em um fluxo assimétrico de pólen dentro de populações heteromórficas (Vuilleumier 1967, Baker 1966, Anderson 1973, Yeo 1975, B. Charlesworth & D. Charlesworth 1979, Ganders 1979a, Gibbs 1986, Barrett & Shore 1987). Lloyd & Webb (1992) apresentam e fundamentam quatro postulados básicos em relação à evolução da distília: a) os ancestrais imediatos de espécies heterostílicas apresentavam hercogamia semelhante à de flores longistiladas; b) a evolução da hercogamia recíproca precedeu a da auto-incompatibilidade e das estruturas secundárias; c) o passo inicial para a hercogamia recíproca foi a evolução do polimorfismo

estigma-altura; d) auto-incompatibilidade heteromórfica dialélica é qualitativamente distinta da auto-incompatibilidade homomórfica multialélica.

2.5. Quebra da heterostilia

A descoberta de variantes da heterostilia típica tem levado à elaboração de hipóteses sobre a sua quebra em direção da autogamia (auto-compatibilidade) ou da xenogamia obrigatória, com o surgimento de espécies dióicas, com indivíduos de sexos separados (Vuilleumier 1967, Gibbs 1990).

É possível que em algumas espécies, segundo Lewis (1979), situações desfavoráveis à polinização cruzada como ineficiência ou ausência de polinizadores podem favorecer a sobrevivência de mutantes auto-compatíveis que originariam populações autogâmicas. Barrett (1989), revisando trabalhos com *Turnera ulmifolia* (distílica) e espécies do gênero *Eichhornia* (tristílicas), conclui que o surgimento de auto-fecundação a partir de sistemas heterostílicos está associado com episódios de colonização e períodos de baixa densidade populacional.

Em *Cordia*, Opler *et al.* (1975) encontraram variações de homostilia a heterostilia, incluindo formas adaptadas a variados polinizadores e modos de dispersão de sementes. Sua proposta é que a heterostilia pode ser quebrada, originando homostilia auto-compatível com variados graus de retenção da auto-incompatibilidade ou evoluindo para dioícia em resposta às pressões seletivas para otimização de certos aspectos secundários, direta ou indiretamente relacionados à reprodução ou a indivíduos separados.

Segundo Ganders (1979 a, b), quando ocorrem mudanças ambientais favoráveis ou domesticação da espécie, a seleção age induzindo principalmente a perda da auto-incompatibilidade, o que leva à homostilia por modificação gênica ou monomorfia, por perda de uma das formas. Raramente ocorre evolução para dioícia, por esterilização do pólen em plantas longistiladas e isolamento do estigma em brevistiladas, que passam a funcionar respectivamente como pistiladas (O) e estaminadas (O). Sua hipótese no caso da quebra da tristilia é que a perda de auto-incompatibilidade pode levar à distilia auto-compatível por perda de uma das formas; à monomorfia, por perda de duas; à quasi-homostilia, no caso de flores muito pequenas e semi-homostilia por recombinação ou

mutação gênica. A auto-incompatibilidade pode ser mantida na formação de distília e semi-homostília.

Beach & Bawa (1980) apresentam uma hipótese para explicar o surgimento de dioícia a partir de distília, baseada na mudança do tipo de polinizadores, resultando em um fluxo unidirecional de pólen de estames longos para estiletos longos. Desta forma, a utilidade e eventualmente a funcionalidade dos estames e estiletos curtos seria eliminada, originando plantas masculinas a partir de brevistiladas e femininas a partir de longistiladas.

Barrett & Shore (1987), em pesquisas com *Turnera ulmifolia*, sugerem a hercogamia monomórfica (separação espacial de estames e estilete através de barreira física) como forma derivada da longi-homostília compatível. Porém, Barrett (1977) evidenciou que em *Eichhornia crassipes* (tristílica) há predominância da morfa medistilada e rara ocorrência da brevistilada, reforçando as idéias de Ganders (1979a,b) sobre a quebra da tristília.

Estudos anteriores aos de Barrett e Ganders apresentam interpretações diferentes como a de Eiten (1963) que propõe, para espécies de *Oxalis*, que a forma homostílica seja primitiva, justificando assim a variação de homostília a uma marcante heterostília, encontrada entre as populações e espécies do gênero. Vuilleumier (1967) vincula homostília à auto-compatibilidade e sugere estados de subdioícia. Entretanto, Ornduff (1966) é contrário a evolução do sistema incrementando a autogamia, sugerindo, com base em estudos com cinco espécies de *Nymphoides*, que a seleção tem favorecido a substituição de distília por dioícia, em certas linhas evolucionárias, aumentando assim a reprodução cruzada pela separação sexual.

Em recente trabalho sobre heterostília, Richards & Barrett (1992) consideram que análises genéticas quantitativas dos processos de desenvolvimento e a determinação das correlações genéticas e fenotípicas dos verticilos florais poderiam ajudar a identificar os fatores envolvidos na formação e quebra da heterostília. Estas, aliadas a estudos comparativos da fisiologia e desenvolvimento, poderiam elucidar o processo complexo da variabilidade floral em espécies heterostílicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de estudo

O trabalho foi desenvolvido na Fazenda Água Limpa - FAL, Universidade de Brasília, DF (Figura 1 e 2), uma das áreas nucleares da Reserva da Biosfera do Cerrado. A vegetação consiste de cerrado em todas as suas categorias fisionômicas, além das matas de galeria e veredas. O local assinalado na Figura 2 como área **A** (15°57'S, 47°55'O, 1060-1080m de altitude) constitui-se de um campo cerrado, cercado por áreas de campo de murundu, campo sujo e pela mata de galeria do Córrego da Onça. A área **A** foi selecionada por ser preservada e possuir uma população reprodutiva natural de *Palicourea rigida*, formada por plantas de aspecto saudável.

Para estudos comparativos relacionados à fenologia, à coloração de inflorescências e flores, às medidas dos verticilos florais e testes experimentais de biologia reprodutiva, outros locais da FAL também foram utilizados, estando assinalados na Figura 2 como áreas: **B** (campo cerrado próximo à cascalheira, *ca* 2 km da área **A**); **C** (cerrado *sensu stricto* na estrada para o Olho d'água da Onça, *ca* 2km da área **A**); **D** (cerrado *s.s.* na estrada para o Córrego Capetinga, *ca* 4km da área **A**). Ainda na região administrativa de Brasília outros locais foram utilizados e estão indicados na Figura 1 como áreas: **E** (Parque Nacional de Brasília - campo sujo próximo ao Córrego do Milho Cozido - 15°40'S, 48°00'O, 1065-1245m); **F** (Estação Experimental da Universidade de Brasília - cerrado *s.s.* - 15°44'S, 47°53'O, 1002m); **G** (Parque Ecológico Norte - campo cerrado perturbado por ação antrópica- 15°46'S, 47°54'O) e **H** (Centro Olímpico da Universidade de Brasília - CO, cerrado *s.s.* perturbado por ação antrópica - 15°53'S, 47°52'O, 1012m). Observações adicionais foram feitas eventualmente no estado de Goiás, em Cristalina, Alto Paraíso e Parque Nacional das Emas.

A área **A** foi delimitada (*ca* 1 000m²), tendo sido marcadas e acompanhadas 40 plantas durante o primeiro período de floração (ago/93 a mar/94). A medida em que floresceram, outras plantas foram também marcadas e acompanhadas perfazendo um total de 50.

O trabalho de campo foi desenvolvido de agosto de 1993 a abril de 1995, com acompanhamento quinzenal, semanal ou diário (quando em época de floração) de até 43 plantas na área A e número variável nas demais áreas.

Dados referentes à precipitação, temperatura, umidade do ar e insolação foram obtidos na Estação Meteorológica do IBGE (15°56'S, 47°53'O, 1100 m), situada em área limítrofe à FAL e são mostrados respectivamente nas Figuras 3, 4, 5 e 6.

3.1.1. Sistema subterrâneo

Para investigação do sistema subterrâneo de *P. rigida* e possíveis interligações existentes em plantas próximas (cerca de 50 cm de distância ou menos), foram feitas algumas escavações, na área A e B. Em função da possível existência de casos em que houvesse ligação subterrânea, o que indicaria a existência de clone, optou-se neste trabalho pela utilização do termo **planta** ao invés de indivíduo.

3.2. Eventos Fenológicos

Para o estudo da fenologia de floração e frutificação de *P. rigida*, primeiramente foi feita uma catalogação de dados das amostras depositadas nos herbários da Universidade de Brasília (UB), IBGE, CENARGEN e Jardim Botânico de Brasília (HEPH), para comparação com os dados obtidos no trabalho de campo. Estes foram registrados quantitativamente para cada planta e para as diferentes populações, durante o período de estudo.

Para melhor entendimento do padrão de floração de *P. rigida* utilizou-se os termos **pequena** e **grande floração** (Lima 1986) aqui representados respectivamente por **PF** (1994) e **GF** (**1-** 1993/94 ou **2-** 1994/95) para os períodos em que a espécie floresceu com menor ou maior intensidade no que diz respeito ao número de indivíduos e à quantidade de inflorescências e flores produzidas. Para a área A foram registrados os dias de: início da floração (primeira planta com flor aberta), meio ou pico (metade das plantas marcadas mais uma com flores abertas) e final (abertura do último botão).

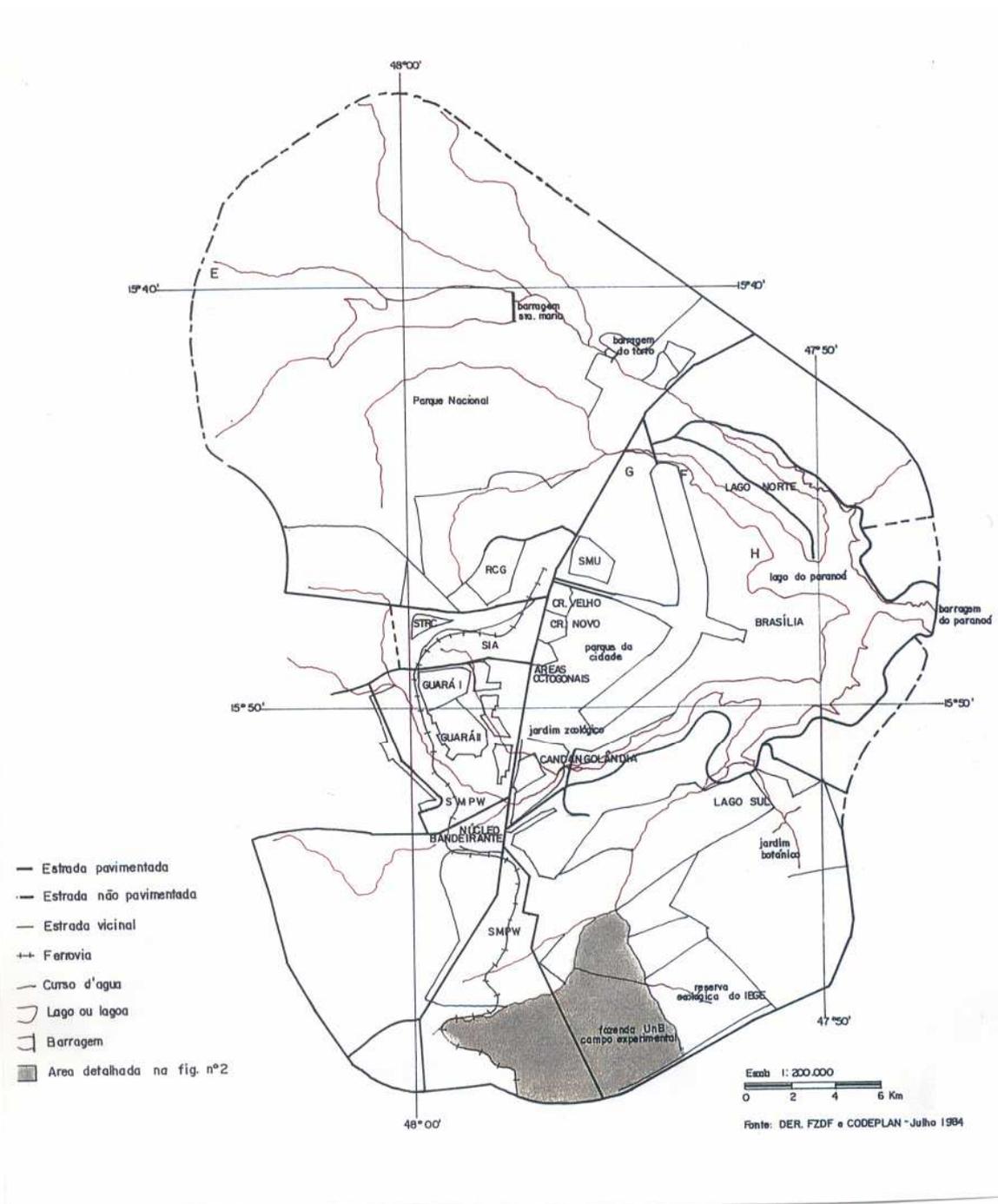


Figura 1 - Mapa da Região Administrativa de Brasília. As letras indicam a localização aproximada das áreas selecionadas: **E** - Parque Nacional de Brasília (campo sujo), **F** - Estação Experimental da Universidade de Brasília (cerrado *s.s.*), **G** - Parque Ecológico Norte (campo cerrado perturbado), **H** - Centro Olímpico da Universidade de Brasília (cerrado *s.s.* perturbado).

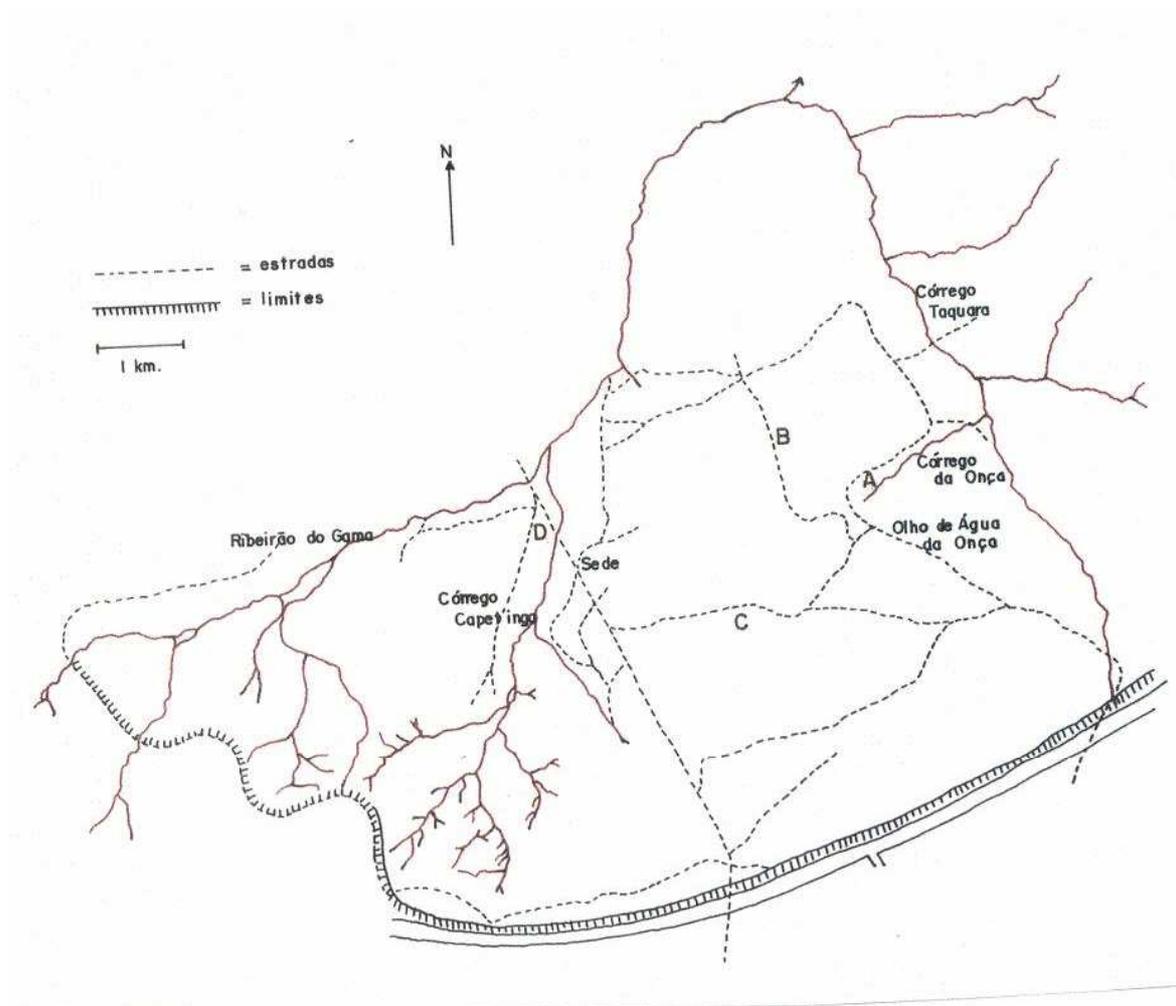


Figura 2 - Mapa da Fazenda Água Limpa (UnB). As letras indicam as áreas de estudo: **A** - campo cerrado, **B** - campo cerrado, **C** - cerrado s.s., **D** - cerrado s.s. Modificado de Ratter (1986).

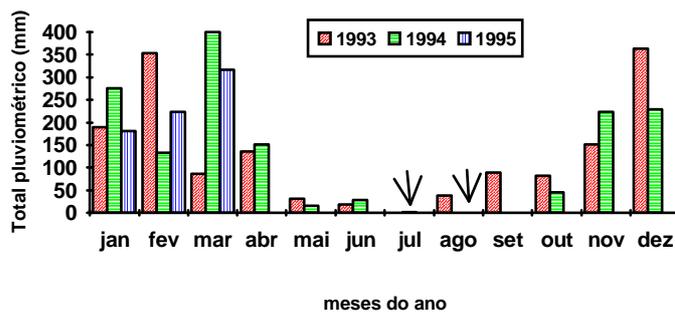


Figura 3 - Valores médios da precipitação total ao longo do período de estudo. As setas indicam ausência de chuvas relacionada com a pequena floração (PF).

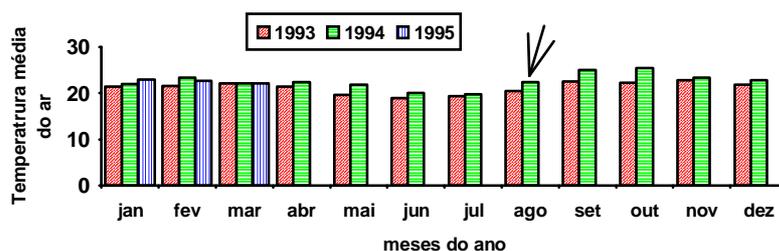


Figura 4- Valores médios da temperatura média do ar ao longo do período de estudo. A seta indica ligeiro aumento dos valores relacionado com a PF.

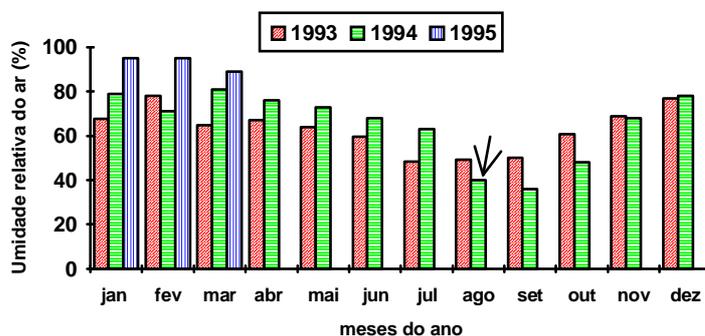


Figura 5 -Valores médios da umidade relativa do ar ao longo do período de estudo. A seta indica diminuição brusca dos valores relacionada com a PF.

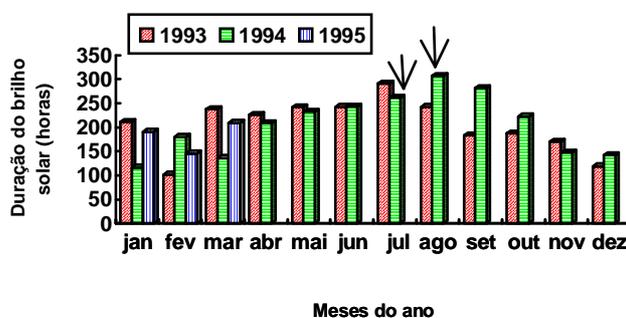


Figura 6 -Valores médios da quantidade de horas de insolação ao longo do período de estudo. As setas indicam aumento dos valores relacionados com a PF.

3.3. Biologia Floral

Como *P. rigida* é uma espécie distílica com flores brevistiladas e longistiladas, estudos morfológicos foram feitos para caracterizar o dimorfismo floral. A morfologia de inflorescências e flores foi analisada no campo e no laboratório, incluindo medições dos verticilos florais com paquímetro SOMET, de material fresco, coletado na área A. Foram medidos os comprimentos do hipântio (do pedicelo até os lacínios do cálice), da corola (incluindo diâmetro da parte mais dilatada e mais estreita), estames (da base da corola até o topo das anteras), anteras, estilete (da base até o topo do estigma) e estigma (da base dos dois ramos até o topo de um deles). O grau de heterostilia morfológica proposto por Eiten (1963) foi calculado utilizando-se a média das razões entre a distância do nível do estigma ao nível da antera e o comprimento do verticilo reprodutivo mais alto da flor.

Anotações da coloração dos botões florais, flores em pré-antese, abertas e senescentes foram feitas *in loco* nas áreas A, B e C. Para detectar a presença de antocianina, pedaços de corolas foram depositados em lâminas de vidro e colocados dentro de placas de Petri com amônia no fundo (Johansen 1940). Para detecção de açúcares, pedaços de corolas foram colocados sobre uma lâmina de vidro, adicionando-se a esta, gotas de reagente de Benedict e em seguida aquecendo-a rapidamente em uma chama (modificado de Weimer *et al.* 1962).

A quantidade de flores por inflorescência foi estimada no final de cada período de floração por meio da contagem dos discos nectaríferos, persistentes até mesmo em frutos maduros. Os discos pertencentes a botões que não chegaram a antese (abortos florais) foram diferenciados dos demais por serem de tamanho reduzido e de coloração escura.

As estratégias e recompensas florais, horário da antese, duração da flor, receptividade do estigma e liberação dos grãos de pólen foram observadas no campo e no laboratório, utilizando-se ramos florais coletados e mantidos em recipiente com água, em uma estufa. A receptividade do estigma foi confirmada em testes com peróxido de hidrogênio a 3% (modificado de Zeisler 1938). Gotas desta solução foram adicionadas a estigmas de flores em diferentes estádios, no campo e laboratório, excisados ou não. A liberação de bolhas de O₂ devido à atividade de peroxidases indica a receptividade do estigma.

Coletas de néctar foram feitas de hora em hora, de 05:00 às 18:00 horas, em diferentes dias, introduzindo-se cuidadosamente na giba de flores ensacadas a agulha de seringas graduadas de 1 ml (Monoject - Tuberculin) para retirada e registro do volume de néctar, transferindo-o em seguida para um refractômetro de bolso ATAGO N1 (Brix 0-32%) para leitura da concentração de açúcar.

A morfologia dos grãos de pólen e sua possível correlação com as papilas estigmáticas foi investigada através de microscópio óptico Zeiss e eletrônico de varredura (MEV) JEOL JEM 840 A. O material observado ao MEV foi preparado conforme Smith & Tiedt (1991), utilizando-se anteras retiradas de flores frescas e fixadas em vapor de tetróxido de ósmio por 24 horas. A presença de lipídios nos grãos de pólen das duas morfais (longi e brevistilada) foi testada por meio do Sudan IV e a presença de amido por meio do lugol (Johansen 1940).

A contagem do número de grãos de pólen foi feita utilizando-se botões florais em pré-antese, colhidos em diferentes locais da FAL, em dezembro de 1993 e junho de 1994 e fixados em álcool 70%. Com ajuda de uma pinça, uma antera era retirada, colocada em uma lâmina de vidro reticulada e sob um microscópio estereoscópico, aberta para retirada dos grãos de pólen. Para evitar ressecamento e perdas de pólen, uma gota de glicerina era acrescentada aos fragmentos da antera e grãos de pólen e o material coberto com lamínula e levado ao microscópio óptico para contagem. Para cálculo da razão pólen/óvulo (Cruden 1977), o total de grãos contados por antera foi multiplicado por 5 (total de anteras por flor) e dividido por 2 (total de óvulos por flor).

Os grãos de pólen foram coletados durante o primeiro semestre de 1994 e testados quanto à sua viabilidade após diferentes intervalos de tempo com a solução corante de Alexander, modificada por Dafni (1992) e em meio nutritivo para crescimento de tubos polínicos (Klein & Klein 1970), com adição de agar ou não e com concentrações de sacarose de 0 a 50%. Foram acrescentados ao meio estigmas de flores brevistiladas e longistiladas em pré-antese e recém abertas. Para observação do crescimento e contagem dos tubos polínicos utilizou-se lâminas de vidro escavadas com fundo quadriculado. Os grãos de pólen e tubos polínicos foram observados, medidos e fotografados em microscópio Zeiss-Axiophot com filme Kodak Plus-Pan 125.

3.4. Biologia reprodutiva

3.4.1. Testes experimentais

Para estudar o sistema reprodutivo foram realizados testes experimentais de polinização artificial no campo (área A) e no laboratório. Durante os testes, as inflorescências foram "isoladas" com sacos de tela de plástico (tela de mosquito - malha de 1 a 1.5 mm), fixados com arame revestido de plástico. As flores, em pré-antese ou recém-abertas, foram marcadas com linhas de diferentes cores para identificação do tipo de tratamento. Em GF2 utilizou-se um anel de algodão hidrófobo no eixo da inflorescência onde os sacos foram fixados, para evitar a entrada de insetos. Para a manipulação das flores e transferência de pólen foram utilizadas diferentes pinças tipo relojoeiro para os dois tipos florais, sempre limpas em álcool e mantidas em recipientes isolados para evitar a contaminação.

Os testes realizados estão relacionados a seguir:

A- Auto-polinização espontânea - Para observação de possíveis frutos formados, foram ensacadas aleatoriamente 12 inflorescências de plantas brevistiladas e 20 de longistiladas durante a GF1; 10 e 13 respectivamente, durante a GF2.

B- Auto-polinização artificial - Grãos de pólen produzidos na mesma flor ou em flores diferentes da mesma planta (geitonogamia) foram transferidos para os estigmas receptivos de 20 flores brevistiladas e 28 longistiladas na GF1 e de 27 flores brevistiladas e 24 longistiladas na GF2. Utilizou-se flores recém-abertas em inflorescências ensacadas.

C- Polinização cruzada - Cerca de 12 horas antes da antese, as flores em inflorescências ensacadas foram emasculadas (as anteras foram removidas) e os estigmas, quando receptivos, na manhã do dia seguinte, receberam pólen de outras plantas da mesma população (polinizações legítimas e ilegítimas), conforme esquema abaixo. As flores longistiladas não foram emasculadas nos tratamentos realizados durante a GF2, por verificar-se que a injúria causada à corola acelerava sua abscisão e tendo em vista que sua morfologia dificulta o contacto do estigma com seu próprio pólen. Esquema dos testes de polinização cruzada efetuados:

Polinizações legítimas

- a) flores longistiladas (doadoras de pólen) X flores brevistiladas (receptoras de pólen).
- b) flores brevistiladas (doadoras de pólen) X flores longistiladas (receptoras de pólen).

Polinizações ilegítimas

- a) flores longistiladas X flores longistiladas
- b) flores brevistiladas X flores brevistiladas.

Em GF1 foram feitas 6 polinizações legítimas em flores longistiladas e 17 em brevistiladas, além de 3 ilegítimas em longistiladas. Durante a PF, 9 flores brevistiladas receberam pólen legítimo, 11 receberam pólen ilegítimo e 1 longistilada recebeu pólen legítimo. Em GF2, 45 brevistiladas e 40 longistiladas receberam pólen legítimo, enquanto 24 brevistiladas e 20 longistiladas receberam pólen ilegítimo. Em função de dificuldades em se conseguir pólen adequado em outras áreas, a maioria dos testes foi realizada utilizando pólen de outras plantas da mesma área, evitando-se que as doadoras estivessem a menos de 5 metros de distância das receptoras.

D- Agamospermia - Para verificar a ocorrência de apomixia (formação de frutos sem que tenha havido fecundação) foi efetuada, na pré-antese, a emasculação de 8 flores longistiladas em GF1; 20 brevistiladas e 26 longistiladas em GF2.

E- Controle/Polinização natural - Foram marcadas aleatoriamente 67 inflorescências de plantas brevistiladas e 91 de longistiladas na GF1 para verificação da taxa natural de formação de frutos (eficácia reprodutiva). Durante a PF foram considerados todos os frutos de inflorescências não ensacadas. Durante a GF2 a contagem de frutos foi feita em 61 inflorescências brevistiladas e 86 longistiladas escolhidas por pertencerem a plantas que já haviam sido usadas em outros testes ou porque já tinham registros de polinização natural nas florações anteriores.

Para estudo do desenvolvimento do tubo polínico *in situ*, dois procedimentos foram seguidos: **a)** flores retiradas de ramos florais mantidos em água, em estufa improvisada no laboratório, foram implantadas em placas de Petri contendo ágar 0,3% e manipuladas conforme o procedimento já descrito para os testes A e C; **b)** flores de inflorescências ensacadas na área A foram preparadas e polinizadas manualmente conforme

os testes A e C. Após 5 minutos, as flores eram destacadas da inflorescência com o pedicelo e implantadas em placa de Petri contendo agar 0,3 %. Em laboratório, flores dos procedimentos **a** e **b** foram coletadas 6:00, 12:00, 24:00, 48:00 e 72:00 horas após o tratamento e fixadas em álcool 70%. Para observação de tubos polínicos utilizou-se a técnica de Martin (1959) para microscopia de fluorescência, modificada por Proença & Gibbs (1994), com redução do tempo de permanência do material em hidróxido de sódio para 5 minutos. Estigmas, estiletos e ovários foram observados e fotografados em microscópio Zeiss-Axiophot com filtro de fluoresceína e filme Kodak Temax 400.

3.4.2. Esforço reprodutivo

Em cada teste de polinização os frutos formados foram contados e observados até a maturação, com retirada de algumas sementes para estudos morfológicos, teste com SUDAN IV e testes de germinação em laboratório. A retirada de frutos maduros foi observada numa tentativa de identificar os agentes envolvidos no processo de dispersão.

Amostras de frutos de *P. rigida* foram coletados em março, abril e maio de 1994 e 1995, na área D (PNB) e nas áreas A, B e C (FAL). Sua polpa foi retirada e as sementes colocadas sobre papel absorvente e expostas ao ar para secagem. Sementes provenientes de 10 frutos foram medidas com paquímetro SOMET. Cerca de 100 sementes foram dissecadas para verificação da presença de embrião e endosperma. A presença de lipídios no endosperma foi testada com Sudan IV (Johansen 1940). A viabilidade do embrião foi verificada por meio do teste com tetrazólio 1% (durante 2:00h no escuro), realizado em 8 embriões com tamanho variando de 0,7 a 1mm, retirados intactos de 10 sementes coletadas há 150 dias, hidratadas durante 15 dias e em 5 embriões retirados de 10 sementes não hidratadas.

Os testes de germinação foram feitos com 250 sementes, em diversos lotes utilizados após 14, 18, 21, 30, 35 e 60 dias de coleta, com variações metodológicas no tempo de duração da desinfestação (1- 10 min) com álcool 70% e/ou hipoclorito de sódio 2%, no uso ou não de escarificação (química, com ácido sulfúrico e mecânica, por incisão ou pressão) e no substrato (papel de filtro em placa de Petri com água destilada ou solo).

3.5. Estudo dos visitantes florais

Para determinação dos polinizadores efetivos de *P. rigida* observou-se o comportamento dos visitantes florais, o horário e a duração das visitas. Sempre que possível, estes visitantes foram fotografados e/ou capturados para serem identificados por especialistas. Os insetos foram asfixiados em éter e mantidos a seco para exame, com a finalidade de detectar locais do corpo utilizados no transporte de grãos de pólen. Os beija-flores foram observados com ou sem binóculo e fotografados para posterior identificação.

Os visitantes florais foram classificados em 5 categorias de acordo com a frequência, fidelidade e comportamento durante as visitas: polinizadores (coletores de néctar e/ou pólen), ladrões de néctar e/ou pólen, coletores de exsudatos, sugadores de seiva e predadores. Para distinção dos polinizadores, utilizou-se os critérios propostos por Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger (1988) que consideram um polinizador exclusivo quando só ele realiza a polinização de uma determinada espécie vegetal, principal quando poliniza com mais eficiência que outros e adicional quando se apresenta como polinizador secundário.

3.6. Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi detectada pelo teste Kolmagoroff-Smirnoff. Para os dados com distribuição normal, utilizou-se o teste t para comparação das médias. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi empregado para comparação dos dados que apresentaram distribuição não-normal.

4. RESULTADOS

4.1. Ocorrência e fenologia

Conforme as observações feitas em diversos locais do Distrito Federal e Goiás, *Palicourea rigida* ocorre em áreas de campo sujo, campo de murundu, campo cerrado, cerrado *s.s.* e campo rupestre. O levantamento feito nos herbários do DF evidencia a ocorrência de *P. rigida* no DF e em outros Estados (GO, TO, MG, SP, PR, MT e BA), em áreas de campo sujo, campo cerrado, cerradão e campo rupestre. *P. rigida* ocorre em simpatria com *P. officinalis* e *P. coriacea*, espécies arbustivas de pequeno porte (em geral *ca* 50cm) em áreas de campo sujo e campo cerrado.

De acordo com os registros do padrão de florescimento obtidos na área A, *P. rigida* tem floração sazonal com dois ciclos anuais de diferentes intensidades, aqui denominados grande e pequena floração ou GF e PF respectivamente. Durante o trabalho acompanhou-se três períodos de floração (Tabela 1): setembro de 1993 a janeiro de 1994 (GF1), maio a início de agosto de 1994 (PF) e setembro de 1994 a março de 1995 (GF2). A Figura 7 mostra a floração das duas morfais nos dois períodos de grande floração acompanhados e o pico de floração verificado no mês de novembro. A observação de plantas em outras áreas do DF e GO confirma a ocorrência dos dois ciclos de floração, iniciando-se a PF no mês de abril de 1994. Os dados coletados em exsicatas (Figura 8) indicam que a floração ocorre nos meses de julho a maio, com intensificação no mês de novembro, e que a frutificação ocorre de novembro a abril, sendo mais intensa em fevereiro e março.

Nas Tabelas 1 e 2 são apresentados dados referentes aos três períodos de floração acompanhados na área A, como duração do período, número de plantas floridas, de inflorescências e flores produzidas e taxa de formação de frutos (eficácia reprodutiva). Foram detectadas variações significativas apenas entre valores referentes ao número de inflorescências e à eficácia reprodutiva. Para plantas longistiladas, observou-se um número significativamente menor de inflorescências na GF2 em relação à GF1 (Teste Mann-Whitney, $P < 0,1$), além de maior eficácia reprodutiva. Para plantas brevistiladas não foram evidenciadas diferenças significativas na quantidade de inflorescências e eficácia reprodutiva nas duas grandes florações (Teste *t*, $P < 0,05$).

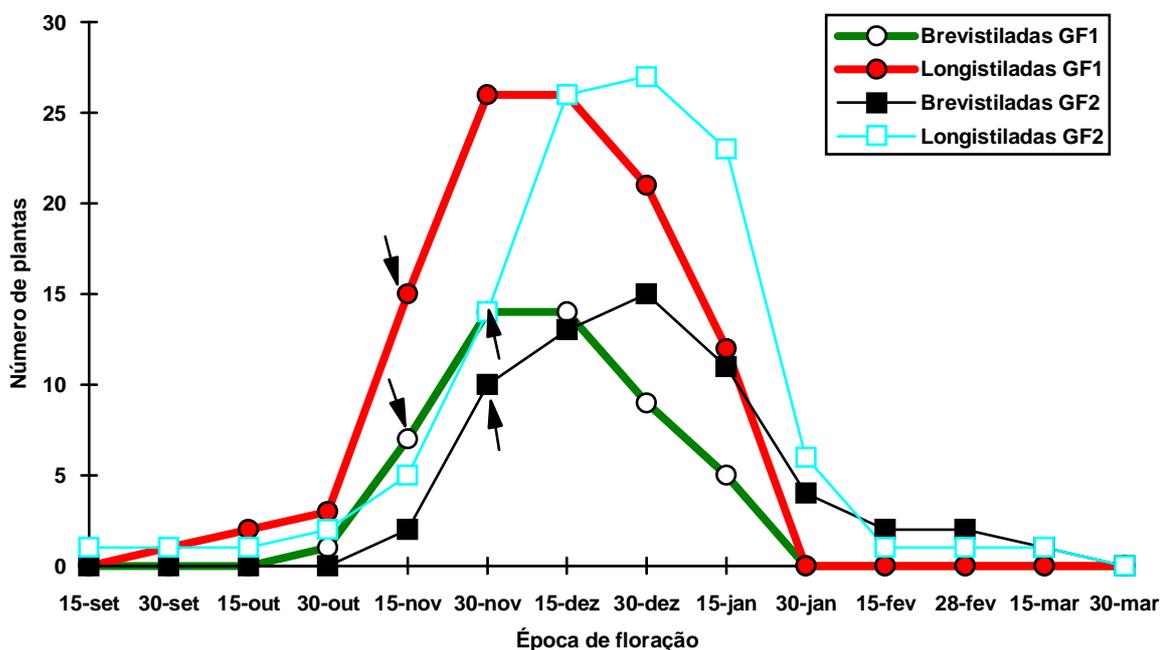


Figura 7 - Floração de plantas brevistiladas e longistiladas de *P. rigida* marcadas na área A - GF1 e GF2. As setas indicam o pico de floração.

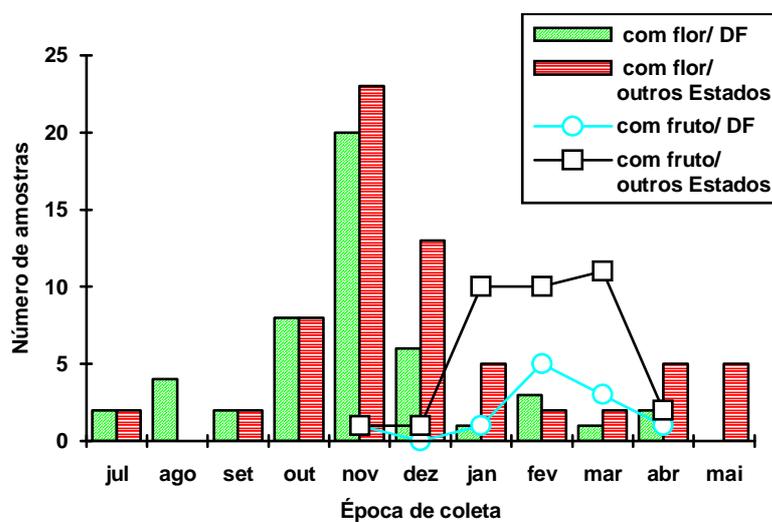


Figura 8 - Levantamento de material fértil de *P. rigida*, depositado nos herbários do D.F. - UB, HEPH, IBGE e CENARGEN.

Tabela 1 - Floração de *P. rigida*. Registros quantitativos das plantas marcadas na área A de agosto de 1993 a abril de 1995 (n= número de plantas; B= brevistiladas; L= longistiladas). Valores antecidos de \pm se referem ao desvio padrão.

Períodos de floração	GF 1	PF	GF 2
Quantidade de plantas	40	3	43
nB:nL	14:26 (1:1,8)	2: 1	15:28 (1:1,9)
Início	20/09/93	15/05/94	14/09/94
Pico*	11/11/93	29/05/94	28/11/94
Encerramento**	28/01/94	03/08/94	21/03/95
Duração média da floração por planta (dias)	64 \pm 12 (nB=14) 60 \pm 17 (nL=26)	78 \pm 15 (nB=2) 58 (nL=1)	57 \pm 23 (nB=15) 57 \pm 24 (nL=28)

*considerou-se como pico de floração o dia em que mais da metade (50% + 1) das plantas em fase reprodutiva apresentavam-se com flores abertas.

** o período de floração foi considerado encerrado no último dia em que se encontrou flores abertas.

Tabela 2 - Caracterização dos períodos de floração observados. Valores médios e desvio padrão registrados para as plantas marcadas na área A de agosto de 1993 a abril de 1995 (n= número; B= brevistiladas ; L= longistiladas ; i= inflorescências; d= dias amostrados).

Períodos de floração	GF 1	PF	GF 2
Número de inflorescências	9 \pm 5 (nB=14) 11 \pm 10 (nL=26)	2 \pm 1 (nB=2) 1 (nL=1)	8 \pm 7 (nB= 15) 6 \pm 4 (nL= 28)
Número de flores por inflorescência	203 \pm 98 (niB= 70) 157 \pm 92 (niL= 110)	171 \pm 154 (niB=4) 160 (niL=1)	206 \pm 118 (niB= 46) 154 \pm 98 (niL= 50)
Número de flores abertas por inflorescência a cada dia	5 \pm 2 (ndB=10) 6 \pm 3 (ndL=11)	7 \pm 3 (ndB=7) 1 \pm 1 (ndL=6)	6 \pm 3 (ndB= 15) 4 \pm 2 (ndL= 17)
Eficiência reprodutiva individual* (%)	25 \pm 13 (nB=10) 17 \pm 7 (nL= 9)	3 \pm 4 (nB=2) 10 (nL=1)	31 \pm 8 (nB = 9) 31 \pm 15 (nL= 18)

*foram utilizados os dados de eficiência reprodutiva (total de frutos/ total de flores x 100) calculada para cada planta.

A Figura 9 discrimina a quantidade média de flores abertas por dia por inflorescência nos meses de observação. Durante a PF, a partir de julho de 1994, verificou-se que os botões florais continuaram a se desenvolver porém a maioria deles não chegou à antese. Em uma das plantas brevistiladas não ocorreu uma única antese floral, apesar de apresentar botões em aparente pré-antese com estigmas receptivos e anteras deiscuentes com liberação de pólen.

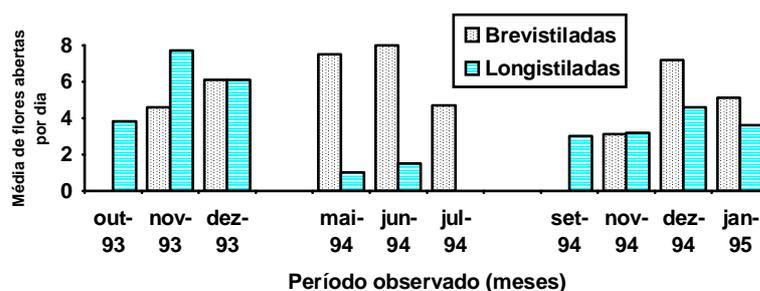


Figura 9- Valores médios de flores abertas por dia, por inflorescência de plantas longistiladas e brevistiladas durante os três períodos de floração observados.

Das 40 plantas marcadas durante a GF1, 6 não floresceram nos outros períodos. Uma planta só floresceu durante a PF. A localização das 50 plantas marcadas e a época em que floresceram durante o período de estudo está na Figura 10.

Nos dias 2 e 3 de outubro de 1994, grande parte da FAL sofreu a ação do fogo, tendo sido atingidas as áreas A, B e C. Na área A, a cobertura herbácea e subarbusciva teve sua parte aérea destruída pela ação do fogo, enquanto em *P. rigida* encontrou-se marcas de sua passagem a 30cm do solo só se registrando efeitos leves na parte aérea como chamuscamento de folhas e inflorescências jovens (Figura 11a). Em aproximadamente 15 dias após a passagem do fogo as plantas estavam com folhas e inflorescências jovens (Figura 11b) e em 30 dias a passagem do fogo era pouco notada na área (Figura 11c).

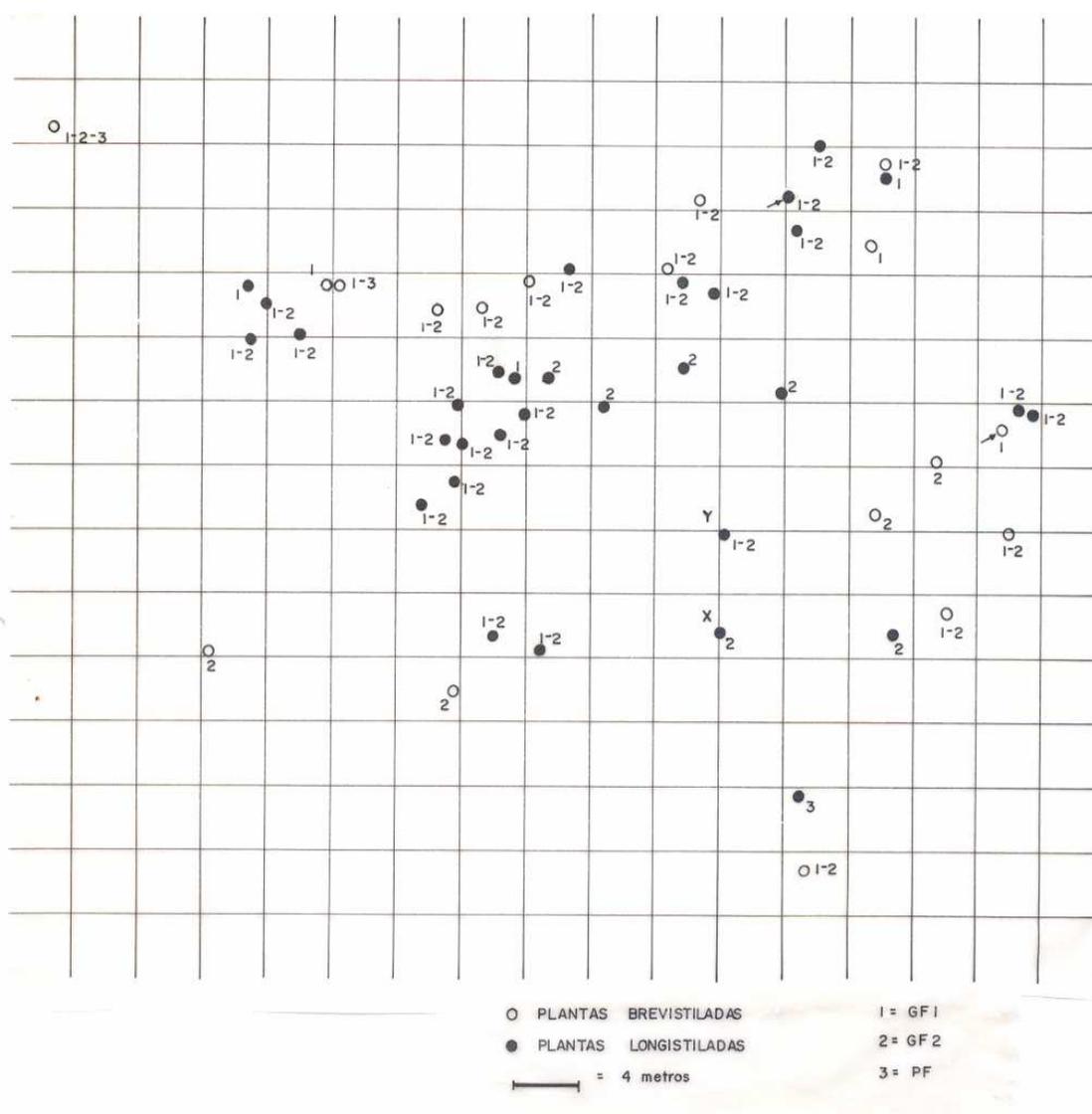


Figura 10 - Localização das 50 plantas de *Palicourea rigida* marcadas na área A. Os números indicam em que período as plantas floresceram. As letras X e Y identificam as plantas caracterizadas na Tabela 11. As setas indicam plantas que perderam a parte aérea após a floração e rebrotaram a partir do sistema subterrâneo.

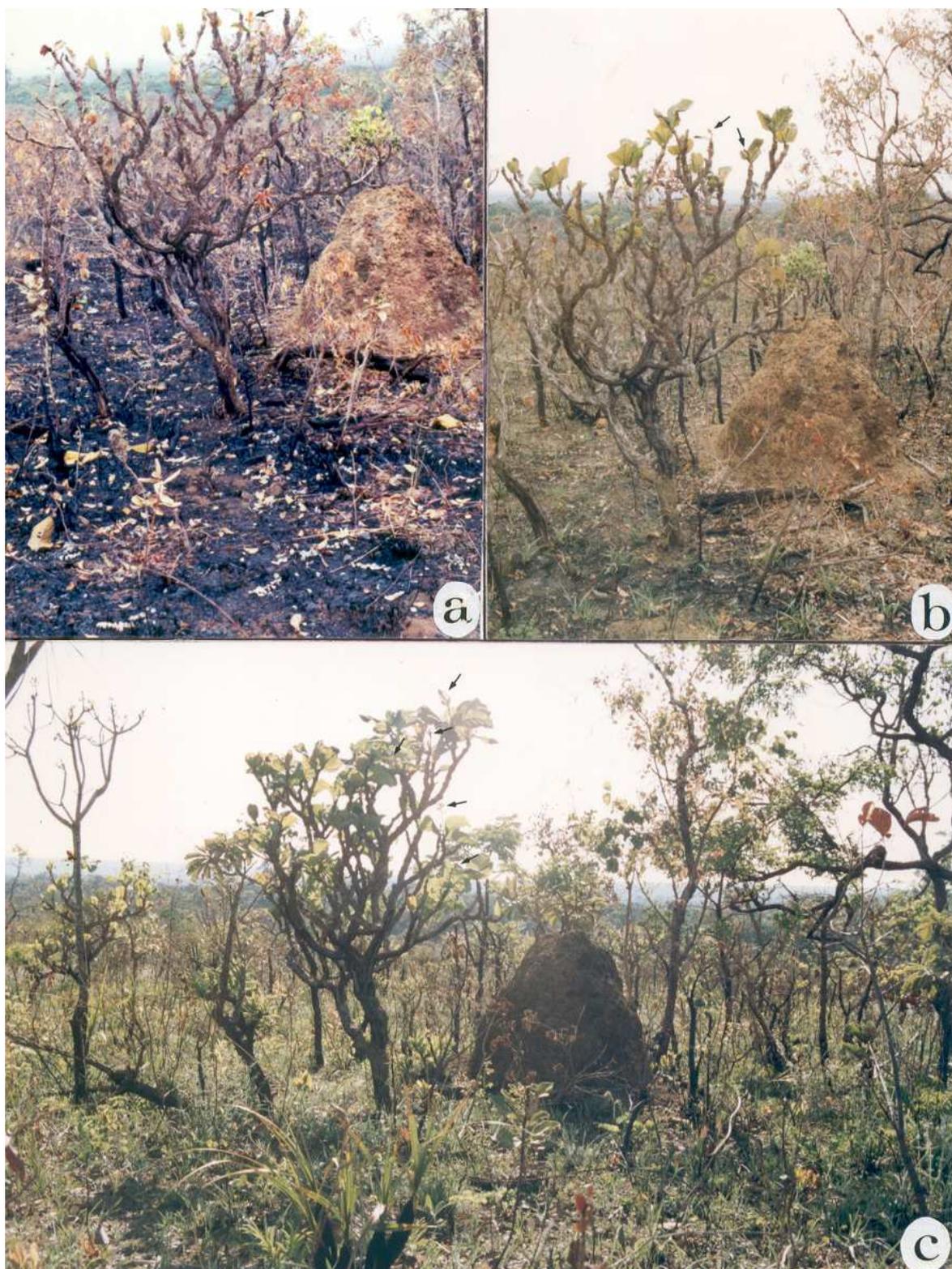


Figura 11 - Registros dos efeitos do fogo na área A em outubro de 1994. (a) após 4 dias. (b) após 15 dias. (c) após 30 dias. As setas indicam inflorescências. O exemplar de *Palicourea rigida* nas fotos tem 2m de altura.

Em relação à distília, foi constatado que na área A, em períodos de floração intensa, houve predomínio da morfa longistilada entre as plantas marcadas (Tabela 1), aproximando-se da proporção 2:1, ou seja para cada planta brevistilada florida existiam duas longistiladas na mesma situação. Em outra área da FAL (área B), embora com uma proporção mais discreta (1,2 :1) as longistiladas também floresceram em maior número. Situação inversa foi encontrada na Área G (CO - cerrado s.s. perturbado) em janeiro de 1995 com 10 plantas brevistiladas floridas e apenas 1 longistilada.

4.1.1. Sistema subterrâneo

Nas escavações realizadas, observou-se que *P. rigida* possui um sistema subterrâneo superficial (Figura 12a, b, c) e sem ligações entre plantas próximas. Duas das plantas observadas apresentavam caule paralelo à superfície do solo por aproximadamente 1m, com elevação vertical dos ramos terminais (ca 0,5m) e raízes a cerca de 5cm abaixo da superfície do solo, paralelas à mesma (Figura 12b). O sistema subterrâneo de plantas adultas pode apresentar ou não uma região entumescida logo abaixo da superfície do solo (Figura 12c). Foram encontrados brotos na base de plantas caídas cuja parte aérea estava morta (Figura 13a), provavelmente originados na região de transição caule-raiz. Após 8 meses da realização das primeiras escavações, foi registrada a presença de 6 brotos em uma raiz paralela à superfície do solo, dois deles ocorrendo muito próximos um do outro (Figura 13b).



Figura 12 - Sistema subterrâneo de *Palicourea rigida*. (a) planta jovem. Escavações feitas na área B em 7 plantas próximas: (b) duas plantas de caule prostrado, (c) planta adulta com 2,20m de altura. **ca** - caule, **ra** - raiz.



Figura 13 - Brotamento a partir do sistema subterrâneo de *Palicourea rigida*. (a) em planta com caule morto. (b) em raiz superficial. **ca** - caule; **ra** - raiz; **ss** - sistema subterrâneo.

4.2. Biologia Floral

4.2.1 - Morfologia de inflorescências e flores

As flores de *Palicourea rigida* estão reunidas em densas inflorescências terminais, pedunculadas, tirsóideas, emitidas entre um par de folhas (Figura 14a, 15). Registrou-se algumas vezes a ocorrência de um par adicional de pequenas folhas no eixo principal da inflorescência (Figura 15b) e de inflorescências não terminais, emitidas diretamente do caule, sem folhas junto ao eixo (Figura 15a). O desenvolvimento dos primórdios até a primeira antese floral dura cerca de 60 dias. O eixo principal de cada inflorescência apresenta subdivisões de várias ordens, havendo sempre na extremidade de cada ramo, uma flor. O tamanho, agrupamento dos ramos e coloração das hastes das inflorescências é bastante variável entre as plantas (Figura 15c a f), bem como a quantidade de flores formadas por inflorescência (Tabela 2). Os eixos principal e secundários apresentam uma gradação de cor que vai do verde-amarelado ao vináceo, independente da cor apresentada pelas flores.

As flores são zigomorfas, diclamídeas e hermafroditas. Possuem hipântio piloso com 5 lacínios discretos. A corola é tubulosa com a base do tubo dilatada unilateralmente em forma de giba e apresenta um denso anel de pêlos longos e sedosos na parte interna. O ovário é ínfero, geralmente bilocular contendo um óvulo basifixo em cada lóculo. Acima dele encontra-se um conspícuo disco nectarífero em forma de anel geralmente bipartido, que envolve a base do estilete. O estigma é do tipo seco papilado, conforme classificação de Heslop-Harrison & Shivanna (1977), em geral bífido, podendo-se encontrar em uma mesma planta flores com estigma tripartido. A forma e o tamanho do estigma diferem nas duas morfias (Figura 14b, c). O androceu é formado por 5 estames adnados à corola até 2/3 de seu comprimento. As anteras são alongadas, dorsifixas, introrsas com duas tecas e deiscência longitudinal (Figura 14). Em 4 plantas da área A encontrou-se flores com aspecto duplo, ou seja, corolas com o dobro do diâmetro médio, com disco nectarífero 4- ou 5-partido, 2 ou 3 estiletos, estigmas 2- ou 3-partidos e 9 estames.

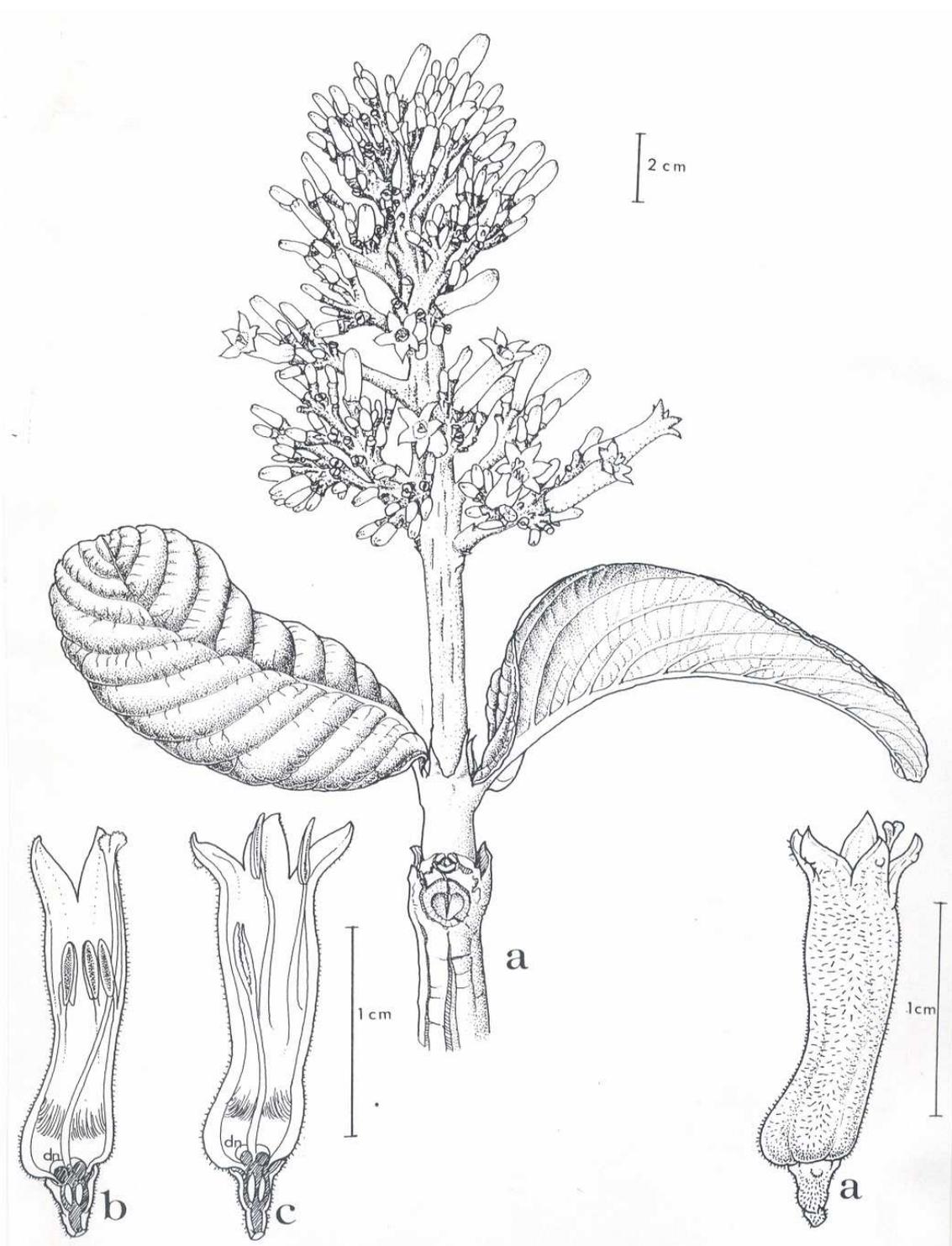


Figura 14 - (a) Ramo florido de *Palicourea rigida* com flores longistiladas e uma flor em destaque. (b) flor longistilada em corte. (c) flor brevistilada em corte. Os cortes mostram a disposição dos verticilos florais após a antese e o disco nectarífero (dn) sobre o ovário bilocular.

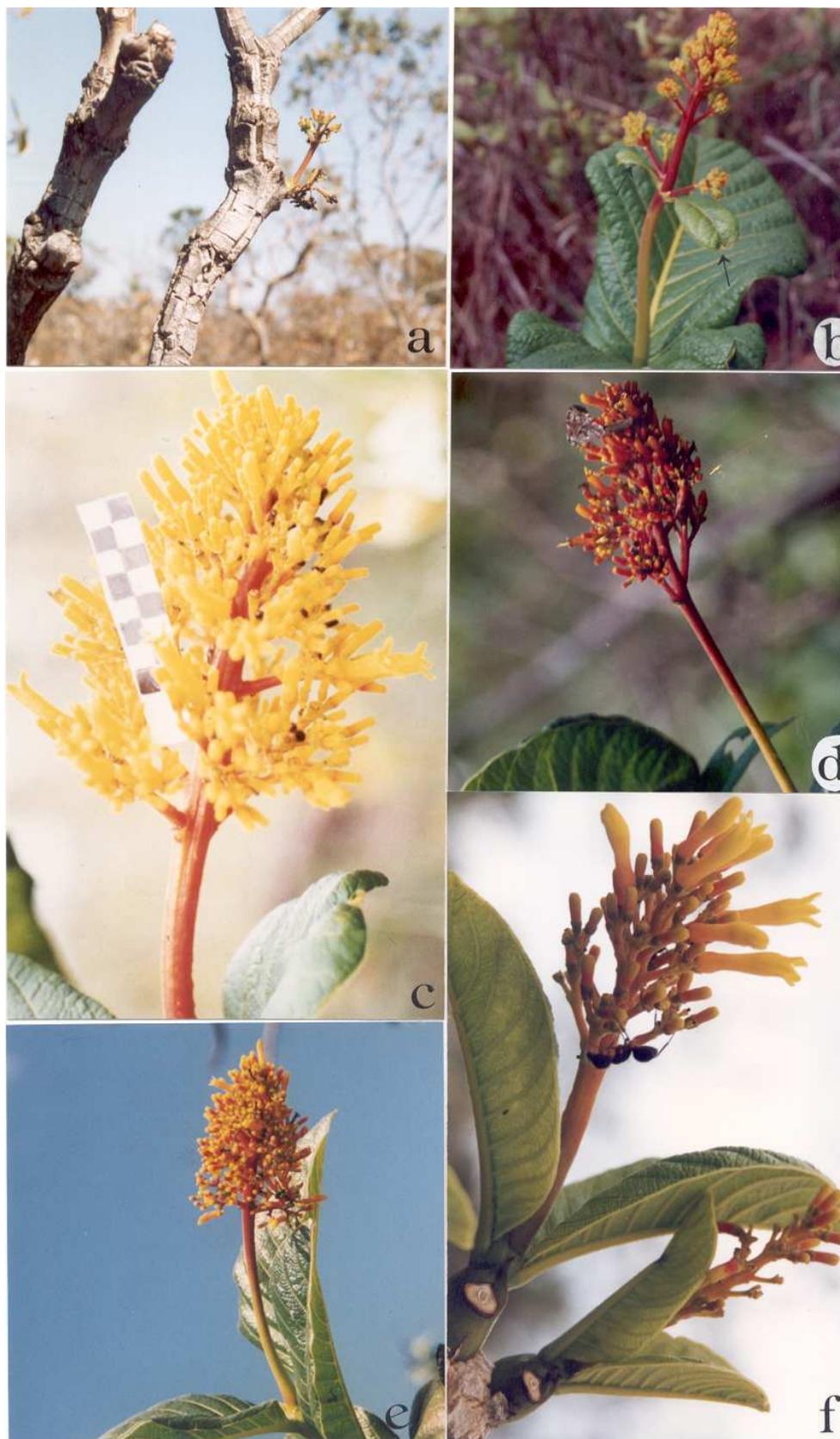


Figura 15 - Morfologia de inflorescências de *Palicourea rigida*. (a) inflorescência axilar. (b) folhas adicionais. Variações de cor, forma e comprimento da raque: (c) raque avermelhada, flores amarelas; (d) raque verde a avermelhado, flores avermelhadas; (e) forma cônica; (f) forma irregular.

A coloração da parte externa da corola em flores de diferentes plantas varia do amarelo ao vermelho, distinguindo-se 3 graduações intermediárias nas flores (Figura 16a): a) base vermelha e parte superior alaranjada; b) toda alaranjada, tendendo a clarear na parte superior, e c) base alaranjada e parte superior amarela, sendo esta graduação a de maior ocorrência (Tabela 3). Os botões são sempre de tonalidade mais escura que as flores, predominando entre eles as cores vermelha e alaranjada. A parte externa da corola apresenta projeções em geral de coloração avermelhada, que ao serem observadas em microscópio estereoscópico, óptico e eletrônico de varredura evidenciaram-se como tricomas glandulares pluricelulares (Figura 17). Em função disto, foi investigada a natureza da parede celular de suas células através do uso de Sudan III que reagiu positivamente indicando que a parede da célula apical dos tricomas é cutinizada. Ao adicionar-se o reagente de Benedict a pedaços de corolas, após rápido aquecimento os tricomas adquiriram coloração marrom amarelada indicando presença de glicose. Houve reação positiva também para a presença de antocianina: os pedaços de corola testados adquiriram coloração verde, mais intensa nos tricomas.

Em aproximadamente 35% das flores de coloração alaranjada a amarela encontra-se estigmas e anteras avermelhados enquanto nas flores vermelhas a parte interna da corola, estames e estiletos, em geral são amarelos. O disco nectarífero também apresenta variação de cor, de amarelo a quase vináceo (sem aparente relação com a cor predominante na corola - Figura 16c e d). Plantas próximas (1 a 2m de distância) em geral apresentam flores de coloração semelhante.

Como a espécie é distílica, encontram-se plantas com flores de estilete exserto e estames insertos (longistiladas) e plantas com flores de estilete inserto e estames exsertos (brevistiladas) (Figura 14b e c; 16b). O nível do estigma em flores brevistiladas corresponde ao nível de anteras nas longistiladas e vice-versa, como se pode observar pelas medidas desses verticilos apresentadas na Tabela 4. Nesta se evidencia também que o tamanho do estigma das duas morfas é diferente.

O grau de heterostilia morfológica (Eiten 1963) foi de $0,33 \pm 0,06$ (n=14) para flores brevistiladas e de $0,29 \pm 0,07$ (n=28) para longistiladas.

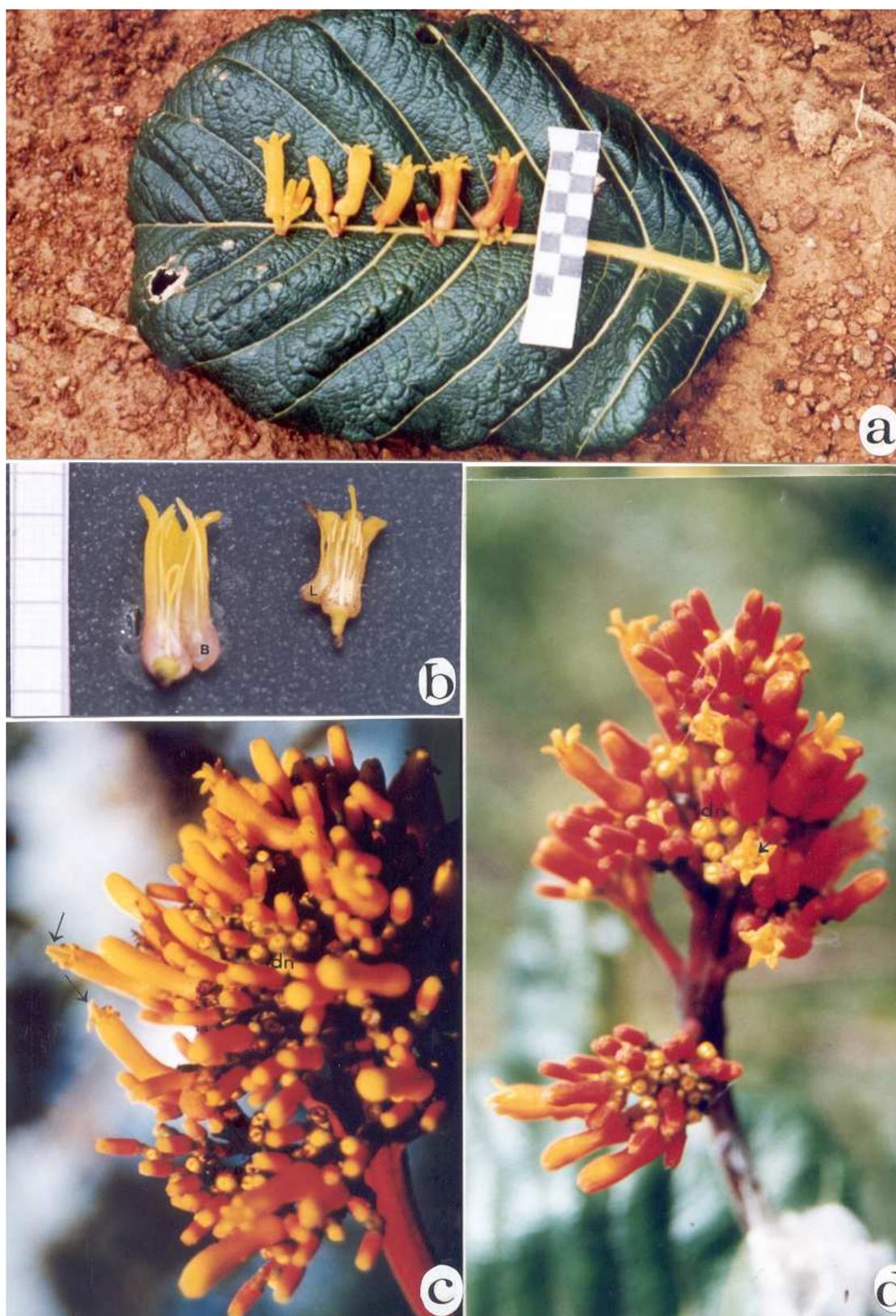


Figura 16 - Morfologia floral de *Palicourea rigida* (a) variabilidade cromática em flores. (b) disposição das anteras e estilete em flor brevistilada **B** e longistilada **L**. (c) flores brevistiladas: a seta indica o anteparo formado pelas anteras. (d) flores longistiladas: a seta indica uma flor em cujo interior se vê a cúpula formada pelas anteras. **dn** - discos nectaríferos.

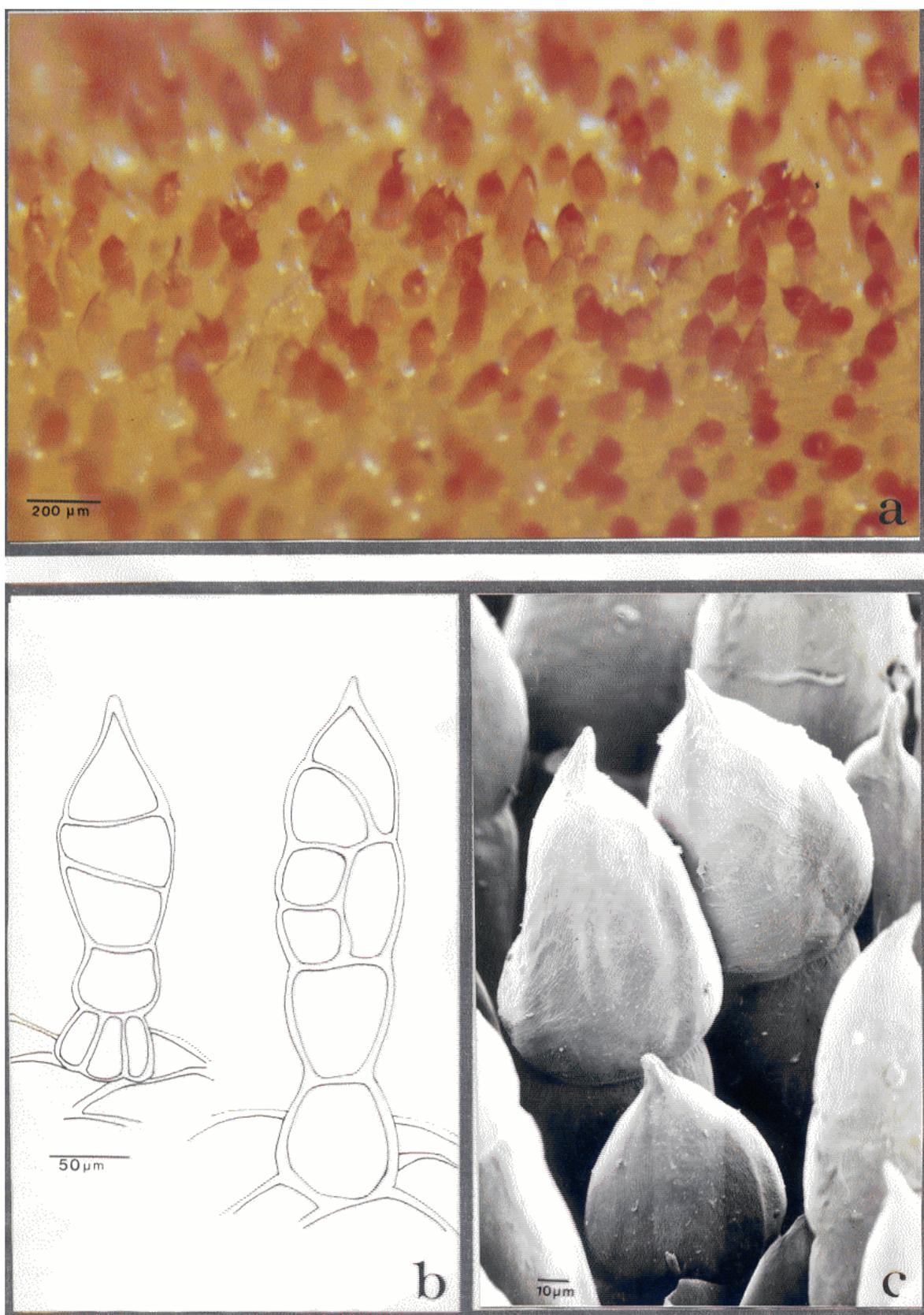


Figura 17 - Tricomas glandulares da corola de flores de *Palicourea rigida*. (a) superfície externa da corola ao microscópio estereoscópico. (b) desenho esquemático mostrando a estrutura pluricelular ao microscópio óptico. (c) aspecto externo ao microscópio eletrônico de varredura.

Tabela 3 - Coloração do tubo corolíneo observada nas áreas A (50 plantas), B e C (40 plantas).

Morfotipo	Longistilada	Brevistilada	TOTAL
Vermelha	2	4	6
Vermelha-alaranjada	8	2	10
Alaranjada	10	10	20
Alaranjada-amarela	29	14	43
Amarela	5	6	11
TOTAL	54	36	90

Tabela 4 - Medidas dos verticilos florais de flores frescas coletadas na área A, durante a GF2. Valores médios e desvio padrão (em mm) obtidos de 4 flores por planta (n= número de plantas).

Morfotipo	Longistilada (n=28)	Brevistilada (n=14)
Altura do hipântio	2,0 ± 0,3	2,3 ± 0,4
Diâmetro da giba	4,8 ± 0,6	4,9 ± 0,5
Diâmetro do tubo	3,3 ± 0,3	3,4 ± 0,3
Altura da corola	18,3 ± 1,3	18,6 ± 1,7
Comprimento do estilete	17,5 ± 1,8	11,4 ± 1,1
Comprimento do estigma	1,4 ± 0,3	3,7 ± 0,7
Comprimento do estame	12,5 ± 1,1	17,0 ± 1,1
Comprimento da antera	3,4 ± 0,4	3,4 ± 0,4

Além do posicionamento dos estames e estiletes, não há evidências de cor ou tamanho das flores e caracteres vegetativos que permitam a distinção de plantas brevistiladas e longistiladas (Tabela 3 e 4).

4.2.2 - Eventos florais

A antese floral ocorre antes do amanhecer, mesmo em ramos coletados e mantidos em frascos com água. Conforme observações na área A e G em dezembro e janeiro de 1995, a abertura das primeiras flores ocorre às 3 horas da manhã, estendendo-se até as 5 horas quando, ao clarear do dia, está concluída para a maioria das flores. Demora cerca de 2 minutos para que os lobos da corola se soltem e até o amanhecer para que eles estejam perpendiculares e/ou levemente fletidos para baixo. Não desabrocham novas flores até 3 horas do próximo dia. A duração de cada flor é de 24 horas, sendo que nas primeiras horas da manhã seguinte à sua antese, estão murchas, com as bordas escurecidas ou já sofreram abscisão da corola. Durante a antese das flores brevistiladas, os estames se

direcionam para o lado oposto da giba (adaxial), com as anteras formando um anteparo (Figura 16c). Nas flores longistiladas, essa posição é ocupada pelo estilete e as anteras formam uma cúpula no centro da corola (Figura 16d).

Observou-se que nas flores brevistiladas a deiscência das anteras, em geral, ocorre na pré-antese, deixando o estigma ainda não receptivo cheio de pólen. Entre as longistiladas notou-se que, em geral, o estigma está receptivo na pré-antese e o pólen disponível somente na antese. A receptividade do estigma é facilmente perceptível pois com a turgidez das papilas estigmáticas, característica da fase receptiva, os ramos do estigma que se apresentavam paralelos, afastam-se em forma de V em flores brevistiladas e de T em flores longistiladas (Figura 16b). A liberação de bolhas (O_2) pelos estigmas quando em contacto com H_2O_2 confirmou as evidências de que o estado receptivo se mantém durante todo o dia caso não ocorra polinização. Algumas vezes foi possível perceber um ligeiro retraimento dos ramos estigmáticos após recebimento de pólen.

As flores são nectaríferas e a produção de néctar inicia-se com a antese e persiste durante o dia, acumulando-se na giba e podendo atingir até a metade do comprimento do tubo corolíneo caso não seja retirado, o que pode ser observado por transparência no caso de flores ensacadas, em dias de alta umidade relativa do ar. O volume médio de néctar coletado em diferentes dias e horários, nos três períodos de floração, bem como a concentração média de sacarose, constam da Tabela 5. Não se verificou diferença significativa na quantidade e na concentração de açúcar do néctar produzido pelas duas morfas.

Tabela 5 - Produção de néctar. Valores médios e desvio padrão do volume (em μ l) e da concentração de sacarose (em %) (B = plantas brevistiladas; L = plantas longistiladas).

Período do dia	Néctar	GF 1		PF		GF 2	
		B	L	B	L	B	L
5 - 10 h	volume (μ l)				10 (n=1)	10 \pm 6 (n=15)	10 \pm 5 (n=12)
	concentração (%)	21,2 \pm 1,6 (n=6)	21,6 \pm 0,8 (n=7)			18,5 \pm 1,7 (n=12)	18,7 \pm 1,9 (n=10)
10 -14 h	volume (μ l)			18 \pm 8 (n=5)		17 \pm 8 (n=7)	12 \pm 6 (n=7)
	concentração (%)	21,5 \pm 1,6 (n=5)	20,6 \pm 1,1 (n=6)			19,7 \pm 1,6 (n=7)	21,1 \pm 1,3 (n=7)
14-18 h	volume (μ l)					18 \pm 4 (n=10)	14 \pm 6 (n=8)
	concentração (%)	20,7 \pm 4,8 (n=2)	20,9 \pm 0,8 (n=2)			18,6 \pm 1,3 (n=3)	19,1 \pm 1,5 (n=3)

4.2.3 - Pólen

Palicourea rigida possui grãos de pólen esféricos, não aperturados que, ao serem liberados das anteras, estão levemente aderidos entre si, formando grumos. Na Figura 18 evidencia-se o agrupamento dos grãos e a substância coesiva que os envolve, provavelmente de natureza lipídica já que o uso de Sudan IV indicou a presença de revestimento lipídico. Ao microscópio óptico não se observou dimorfismo entre os grãos produzidos pelas diferentes morfais, mas ao MEV (estudo preliminar) encontrou-se diferenças no diâmetro do pólen ($54,2\mu\text{m} \pm 2,6$, $n=20$ para brevistiladas e $51\mu\text{m} \pm 4,6$, $n=24$ para longistiladas), significativas de acordo com Teste *t*, $P<0,01$. Diferenças intermórficas na escultura da exina não foram observadas (Figura 18). A coloração resultante do uso de lugol indicou a presença de amido nos grãos.

A razão pólen-óvulo calculada utilizando flores da GF1 e da PF (Tabela 6) não indica diferenças significativas na produção de grãos de pólen entre as morfais nos dois períodos.

Tabela 6 - Razão pólen-óvulo em flores de *P. rigida* (n = número de flores amostradas). Os valores se referem à média e desvio padrão.

Período de coleta	Flores brevistiladas	Flores longistiladas
GF 1	$1305,0 \pm 183,3$ ($n=10$) ^a	$1425,7 \pm 289,3$ ($n=10$) ^a
PF	$1230,5 \pm 188,8$ ($n=20$) ^a	$1306,0 \pm 273,1$ ($n=20$) ^a

Médias seguidas pela letra ^a não apresentaram diferenças significativas no Teste *t*, $P<0,1$

Os testes com a solução de Alexander modificada por Dafni (1992) indicaram grãos de pólen não viáveis em amostras testadas até 4 horas após a coleta, atingindo 80% após 24 horas. Os testes com solução nutritiva indicaram perda da capacidade de formação de tubos polínicos após 4 horas de coleta (Tabela 7). Em função disto, pólen e estigma das duas morfais foram coletados e em seguida colocados em 5 frascos contendo 1ml de meio nutritivo com concentrações crescentes de sacarose, verificando-se maior porcentagem de tubos polínicos formados em meio com sacarose a 10% (p/v). O procedimento anterior foi repetido (Tabela 7) com adição de estigmas de flores em pré-antese (p.a.) e recém-abertas (r.a.). Registrou-se maior quantidade de tubos polínicos em preparações com estigmas da mesma morfa e, para longistiladas, também naquelas com estigmas de flores brevistiladas recém-abertas (Tabela 7). Após 2:00 h em solução de sacarose 10%, os tubos polínicos de brevistiladas atingiram comprimentos de até $790\mu\text{m}$, e os de longistiladas $390\mu\text{m}$ (Figura 19).

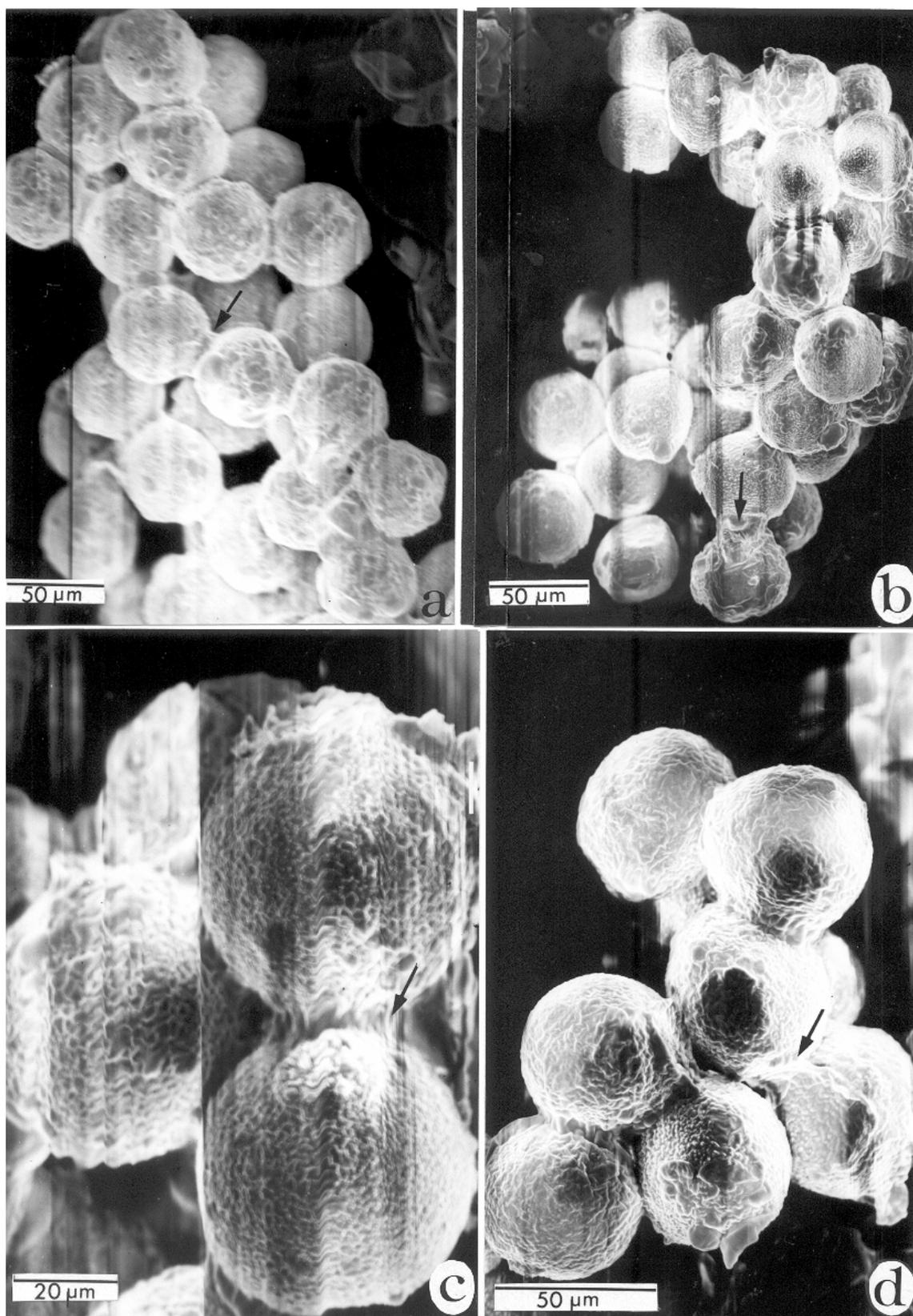


Figura 18 - Grãos de pólen de *Palicourea rigida* observados ao microscópio eletrônico de varredura. (a) e (c) flores brevistiladas. (b) e (d) flores longistiladas. As setas indicam a substância coesiva que os envolve.

Tabela 7- Porcentagem de tubos polínicos formados em meio com sacarose 10% (n= número de grãos de pólen; B = flor brevistilada; L = flor longistilada; p.a.= pré-antese; r.a.= recém-abertas).

Material utilizado	Testes efetuados no campo	Testes efetuados 4h após a coleta de pólen
pólen B	58 (n=287)	4 (n=313)
pólen B/estigma B r.a.	72 (n=228)	4 (n=050)
pólen B/estigma L p.a.	48 (n=231)	5 (n=136)
pólen B/estigma L r.a.	40 (n=464)	5 (n=128)
pólen L	60 (n=120)	0 (n=104)
pólen L/estigma L r.a.	80 (n=375)	0 (n=093)
pólen L/estigma B p.a.	68 (n=186)	0 (n=112)
pólen L/estigma B r.a.	80 (n=118)	0 (n=087)

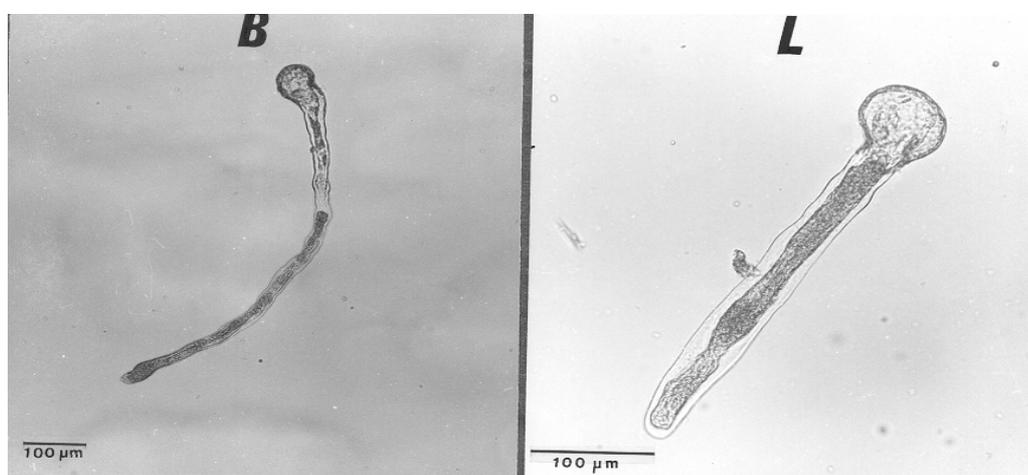


Figura 19 - O maior tubo polínico de flor brevistilada (B) e de longistilada (L) de *P. rigida*, formados em solução nutritiva com sacarose 10%.

4.3. Biologia reprodutiva

4.3.1. Testes experimentais

Os dados obtidos nos testes experimentais de polinização (Tabela 8 e abaixo) mostram que *P. rigida* é uma espécie auto-incompatível, não apomítica.

Os resultados dos testes de polinização realizados durante a PF foram: em polinizações cruzadas legítimas 44% de sucesso para brevistiladas ($\frac{\text{frutos formados}}{\text{total de flores}} \rightarrow \frac{4}{9}$) e 100% para longistiladas ($\frac{\text{frutos formados}}{\text{total de flores}} \rightarrow \frac{1}{1}$); em polinizações ilegítimas de brevistiladas não houve sucesso ($\frac{\text{frutos formados}}{\text{total de flores}} \rightarrow \frac{0}{11}$). Os resultados dos testes realizados durante a GF1 e GF2 estão na Tabela 8.

A média de abortos florais (botões que não chegaram à antese) na GF2 para plantas brevistiladas foi de $18\% \pm 6$ (n=9) e para longistiladas $23\% \pm 13$ (n=17).

Analisando a Tabela 8, percebe-se que nos testes de auto-polinização espontânea (teste A) a formação de frutos ocorreu, porém com índices baixos - 0,6 a 4,0% - em relação ao Controle (teste E) - 14,7 a 39,9 %.

Nos testes de auto-polinização artificial e polinização ilegítima fica evidente a incompatibilidade autógama e intramórfica para as plantas brevistiladas, resultado considerado também para as longistiladas. Os 2 frutos formados de auto-polinização artificial são de uma única planta (aqui denominada planta X), sendo a mesma responsável pela elevação do número de frutos no teste de auto-polinização espontânea de plantas longistiladas da GF2, em relação às brevistiladas e à GF1.

O sucesso das morfais nos testes de polinizações cruzadas legítimas sofreu uma inversão nas duas florações testadas, evento registrado também para o Controle (condições naturais). Em GF1 as plantas brevistiladas obtiveram maior sucesso na formação de frutos. Em GF2 verificou-se o mesmo para as longistiladas.

Não houve formação de frutos nos testes para verificação de agamospermia.

Tabela 8 - Dados obtidos nos testes experimentais de polinização (n= quantidade de plantas, fl= número de flores polinizadas, fr= números de frutos formados).

Período de floração	GF 1		GF 2		
	Testes	fr/fl	% sucesso	fr/fl	% sucesso
Auto-polinização espontânea					
brevistiladas	24/1979	1,2 (n= 9)	5/781	0,6 (n=2)	
longistiladas	16/2117	0,8 (n=10)	79/2023	4,0 (n=8)	
Auto-polinização artificial					
brevistiladas	0/20	0 (n=4)	0/27	0 (n=5)	
longistiladas	0/28	0 (n=5)	2/24	8,0 (n=5)	
Polinização cruzada legítima					
brevistiladas	9/17	52,9 (n=4)	17/45	31,1 (n=3)	
longistiladas	1/6	16,7 (n=2)	32/40	80,0 (n=3)	
Polinização cruzada ilegítima					
brevistiladas			0/24	0 (n=4)	
longistiladas	0/3	0 (n=1)	1/20	5,0 (n=4)	
Agamospermia					
brevistiladas			0/20	0 (n=4)	
longistiladas	0/8	0 (n=2)	0/26	0 (n=6)	
Polinização natural (Controle)*					
brevistiladas	2805/12646	22,2 (n=10)	3149/10353	30,4 (n=9)	
longistiladas	2004/13658	14,7 (n=9)	4086/10243	39,9 (n=18)	

* total de flores e frutos formados naturalmente em plantas utilizadas nos demais testes.

Com relação ao estudo do desenvolvimento de tubos polínicos no gineceu, em microscópio de fluorescência foi observado que:

a) em auto-polinizações de flores longistiladas, independente do tempo pós polinização, os tubos polínicos são encontrados em quase toda a extensão do estilete ($\frac{4}{5}$), sendo bloqueados em sua porção basal. Apresentavam forte fluorescência, muitos *plugs* de calose, porções dilatadas e ramificadas (Figura 20a) e diâmetro maior que o de tubos polínicos formados após polinizações legítimas. Estes últimos atingiam a porção estilar final, possuíam menor quantidade de *plugs* e fraca fluorescência, além da ausência de porções dilatadas e ramificadas (Figura 20b). Nos cruzamentos ilegítimos observou-se que a maioria dos tubos polínicos formados eram dilatados e ramificados (Figura 20c), atingindo a porção estilar média e *ca* 10% eram mais finos e delgados percorrendo até $\frac{3}{4}$ do estilete.

b) em flores brevistiladas auto-polinizadas, também independente do tempo de coleta após os testes, observou-se grande quantidade de tubos dilatados, curvos e curtos (os maiores com comprimento médio de 320 μ m), principalmente na superfície do estigma (Figura 21a) com pequena penetração, sendo que alguns chegaram a atingir o quinto superior do estilete. Observações semelhantes a essas também foram feitas no caso de polinizações ilegítimas (Figura 21c). Os tubos polínicos desenvolvidos após polinizações legítimas atingiam a porção estilar final, sendo extremamente estreitos e retos, com poucos *plugs* e apresentando fraca fluorescência (Figura 21b).

Nas preparações com ovários, não foram observados tubos polínicos, independente do teste efetuado e do tempo de coleta após a polinização.

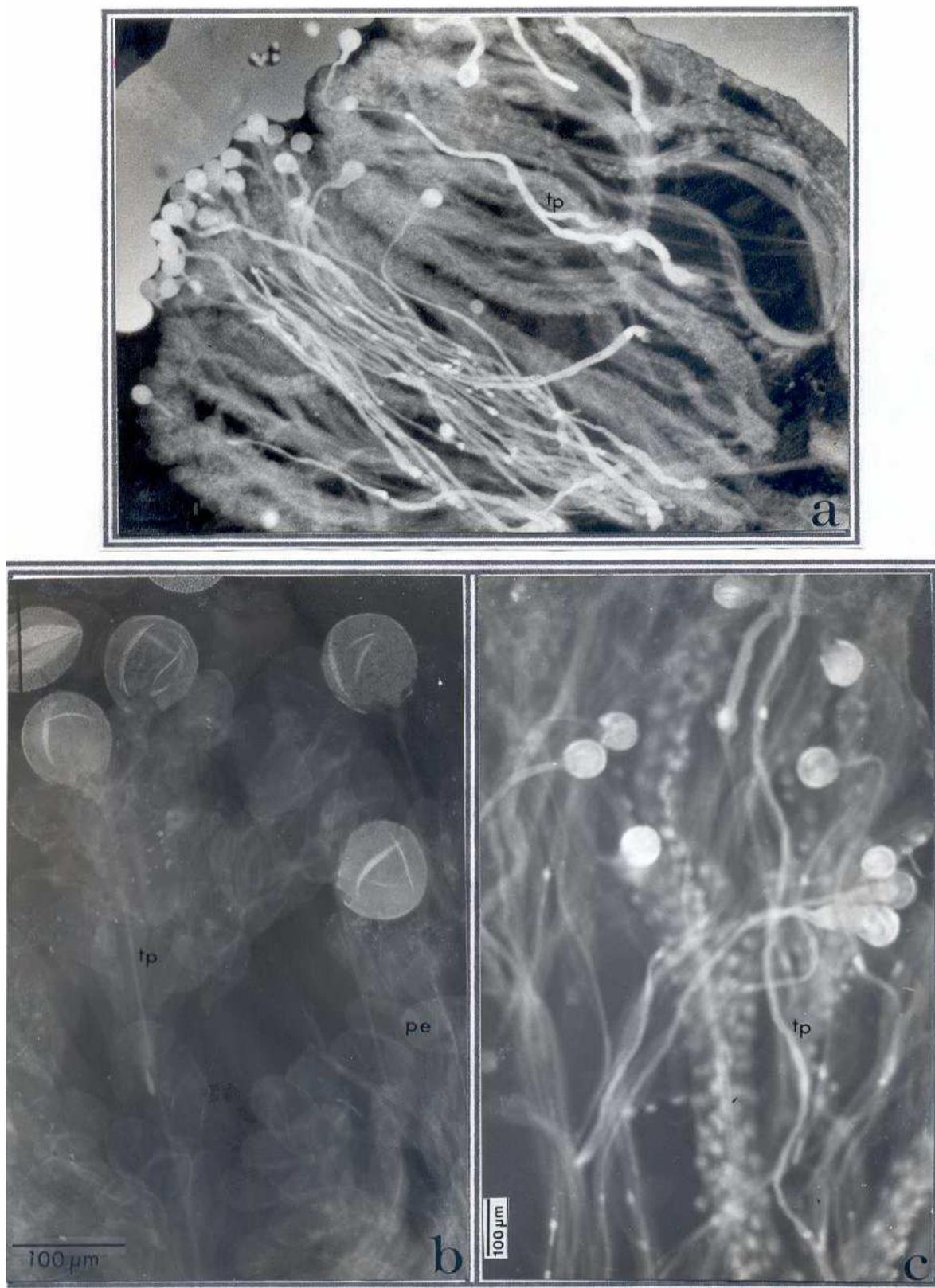


Figura 20 - Tubos polínicos no estigma e estilete de flores longistiladas de *Palicourea rigida*. (a) 48:00 h após autopolinização. (b) 24:00 h após polinização legítima. (c) 6:00 h após polinização ilegítima. **tp** - tubo polínico. **pe** - papilas estigmáticas.

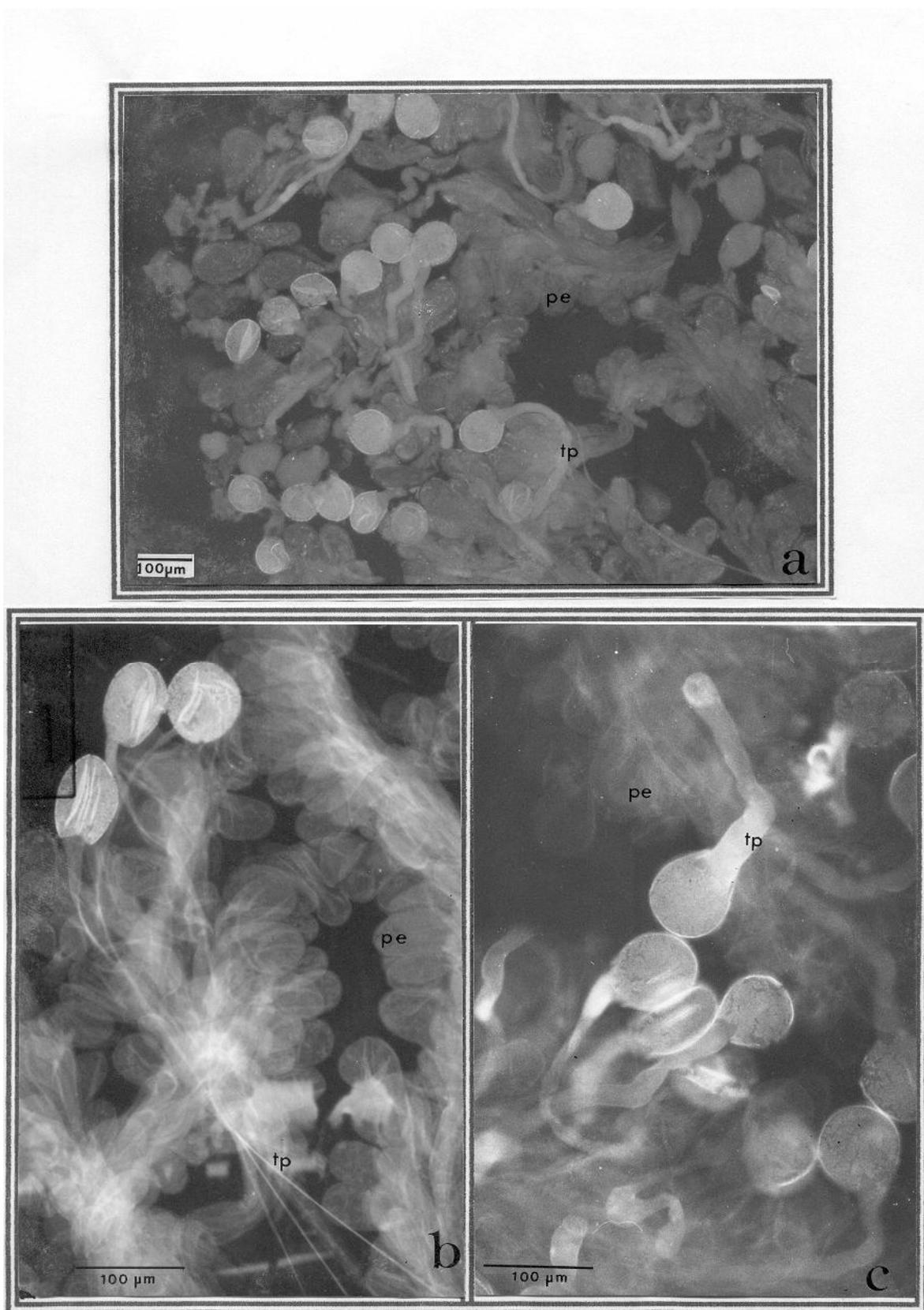


Figura 21 - Tubos polínicos no estigma de flores brevistiladas de *Palicourea rigida*. (a) 24:00 h após autopolinização. (b) 24:00 h após polinização legítima. (c) 24:00 h após polinização ilegítima. **tp** - tubo polínico

4.3.2. Esforço reprodutivo

A formação de frutos, evidenciada pelo entumescimento inicial do hipântio, é perceptível *ca* 10 dias após a polinização. O desenvolvimento é lento, levando em média 75 dias para chegar à maturação. Na GF1 e GF2 os frutos das plantas da área A começaram a amadurecer no final de fevereiro. Durante o mês de março intensificou-se o processo de amadurecimento, que prolongou-se durante o mês de abril. Ao final deste mês, a maioria dos frutos verdes remanescentes estavam danificados pela ação de insetos (Figura 22a) e/ou fungos (Figura 22b). Aproximadamente $\frac{1}{3}$ dos frutos maduros de cada inflorescência eram "removidos" por dia (Figura 22c); todavia, não houve registros diretos da presença de frugívoros que poderiam estar atuando como dispersores.

A eficácia reprodutiva - formação de frutos em condições naturais - das plantas marcadas na área A apresentou variações individuais e entre períodos como mostrado na Tabela 2 e 8. Plantas longistiladas foram mais eficientes na produção de frutos durante a GF2. A eficácia reprodutiva foi calculada utilizando o número de frutos formados, já que a estimativa de frutos que amadureceram não foi possível nos 3 ciclos de floração. A maioria das plantas perde inflorescências quando os frutos estão formados e começam a amadurecer. O peso dos frutos aliado às chuvas fortes comuns no mês de março parecem ser os responsáveis pela drástica diminuição da quantidade de frutos por indivíduo. Além disto, algumas plantas apresentaram sintomas da antracnose, doença causada por fungos que foram isolados de folhas e frutos e identificados como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (Wilma R. C. Ribeiro, comunicação pessoal). Esta doença, comum em plantas cultivadas, ataca as folhas, hastes das inflorescências e frutos imaturos de *P. rigida*, que tornam-se escuros e secos ("mumificados" - Figura 22b). Ao final do mês de abril de 1995, 30% das plantas haviam perdido todas as inflorescências (com frutos em processo de maturação), 52 % parte delas e apenas 18 % mantinham todas as inflorescências formadas.

Os frutos de *P. rigida* são drupáceos com peso fresco médio de 240mg, coloração verde e mais raramente vinácea quando imaturos e preta-arroxeadas quando maduros (Figura 22a, c, Figura 23). As médias das medidas de frutos (n=20) são: 7,8mm \pm 1,3 para o maior diâmetro, 6,1mm \pm 1,3 para o menor diâmetro e 6,3mm \pm 1,6 para a altura. Os frutos geralmente contêm duas sementes. Nas coletas realizadas, verificou-se que 37% dos frutos apresentavam sementes de tamanho semelhante e 63% continham sementes

notadamente desiguais (Figura 23c - Tabela 9). As sementes pequenas (31% do total amostrado) são ocas, sem endosperma e embrião, sendo portanto inviáveis. Nas sementes maiores (69% do total amostrado), o endosperma ocupa todo o espaço interno, ao redor do embrião. O endosperma contém lipídios evidenciados em reação com Sudan IV. Observou-se também que 4% das sementes estavam danificadas por insetos e seu conteúdo parcial ou totalmente destruído. Assim, 65% das sementes produzidas estavam possivelmente viáveis.

O embrião de *P. rigida* é alongado (ca 1mm de comprimento) com uma das extremidades dilatada (ca 0,5mm de largura), que corresponde aos dois cotilédones (Figura 23d).

Tabela 9- Tamanho das sementes de frutos* coletados após a grande floração 1993/94 (1) e 1994/95 (2).**

Sementes	Iguais (n=6)	Desiguais (n=14)		1-Tamanho médio (n=20)	2-Tamanho médio (n=20)
		maior	menor		
Comprimento(mm)	4,7 ± 0,3	4,5 ± 0,4	3,0 ± 0,3	4,3 ± 0,5	4,3 ± 0,3
Largura(mm)	3,1 ± 0,1	3,8 ± 0,4	2,2 ± 0,3	2,7 ± 0,5	2,5 ± 0,4

*sem distinção da morfa floral; **dados do Projeto Tamanho e peso dos frutos e sementes das espécies vegetais do Cerrado, não publicados.

Os embriões retirados de sementes com 150 dias de armazenagem a seco apresentaram coloração rósea no teste com tetrazólio, indicando atividade enzimática embrionária. A coloração foi mais intensa nos embriões retirados de sementes previamente embebidas. Apesar da indicação de viabilidade dos embriões, em todas as montagens de germinação, houve aparente embebição das sementes mas em nenhuma delas houve germinação. Em todos os tratamentos, as sementes foram infestadas por fungos após períodos que variaram de 5 dias a 3 semanas.

A formação e amadurecimento de frutos na pequena floração apresentou algumas particularidades. Uma planta brevistilada não formou frutos e a única planta longistilada com flores na área A encerrou a floração com 17 frutos formados e após 60 dias apresentou 113 "estruturas" cujo tamanho era aproximadamente igual ao dos hipântios, com polpa de coloração e consistência semelhante à de frutos maduros, mas contendo óvulos e não sementes em seu interior. Durante a GF2 observou-se a formação de tais "estruturas" em duas outras plantas longistiladas. Aproximadamente 70 dias após o encerramento da floração, 25 hipântios apresentaram-se entumescidos, com aspecto carnoso e começaram a "amadurecer" após ca 15 dias (Figura 24).



Figura 22 - Morfologia de frutos de *Palicourea rigida*. (a) frutos verdes e maduros que sofreram a ação de insetos. A seta indica sementes aparentes. (b) sintomas da antracnose. As setas indicam lesões nas folhas e frutos “mumificados”. (c) frutos verdes e maduros. A seta indica um pedicelo de onde um fruto maduro foi retirado, acima um pedicelo e disco nectarífero de flor que não formou fruto.

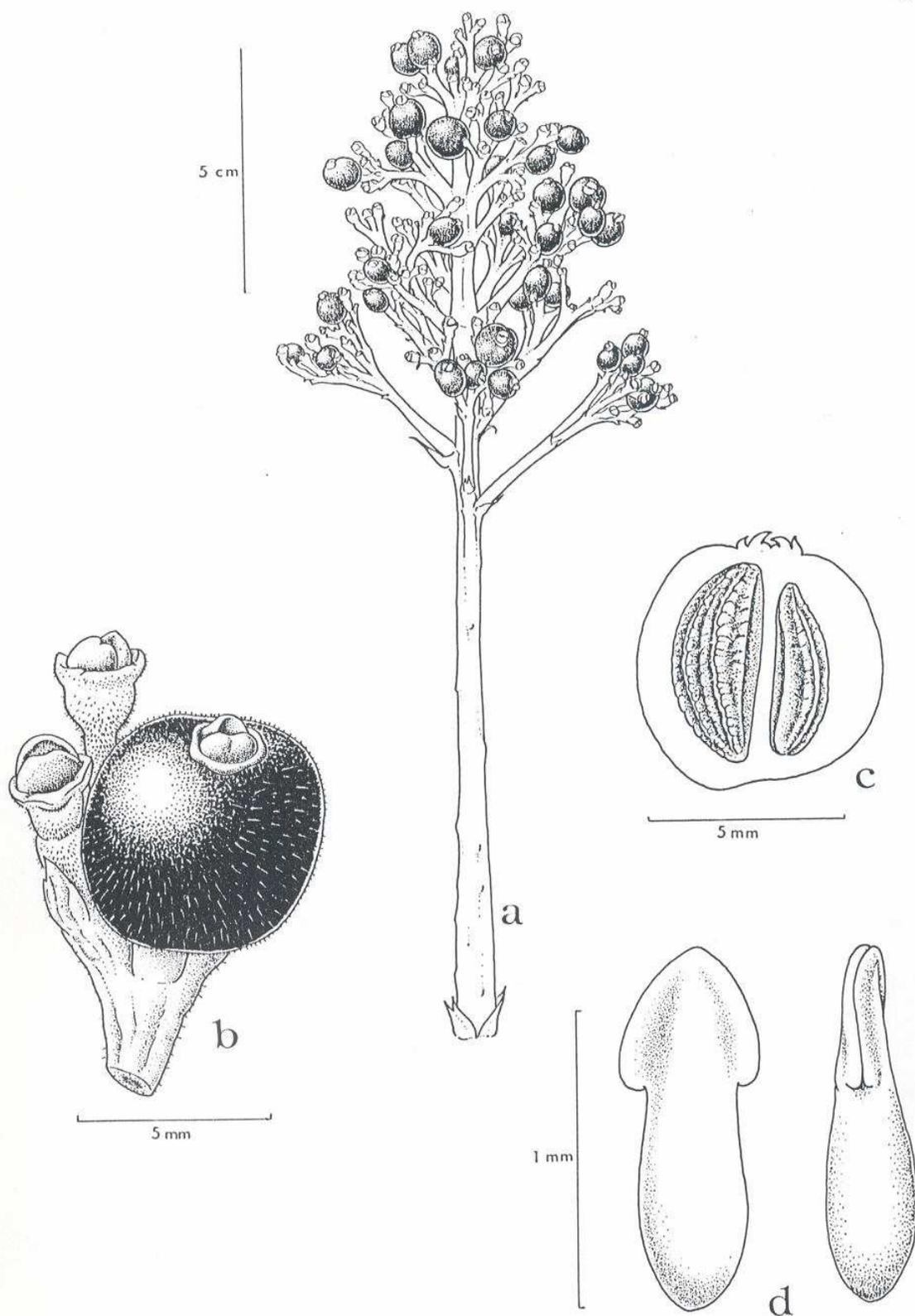


Figura 23 - (a) aspecto geral do ramo floral de *Palicourea rigida* com frutos. (b) aspecto externo de um fruto maduro. (c) fruto maduro em corte mostrando duas sementes desiguais. (d) embrião.

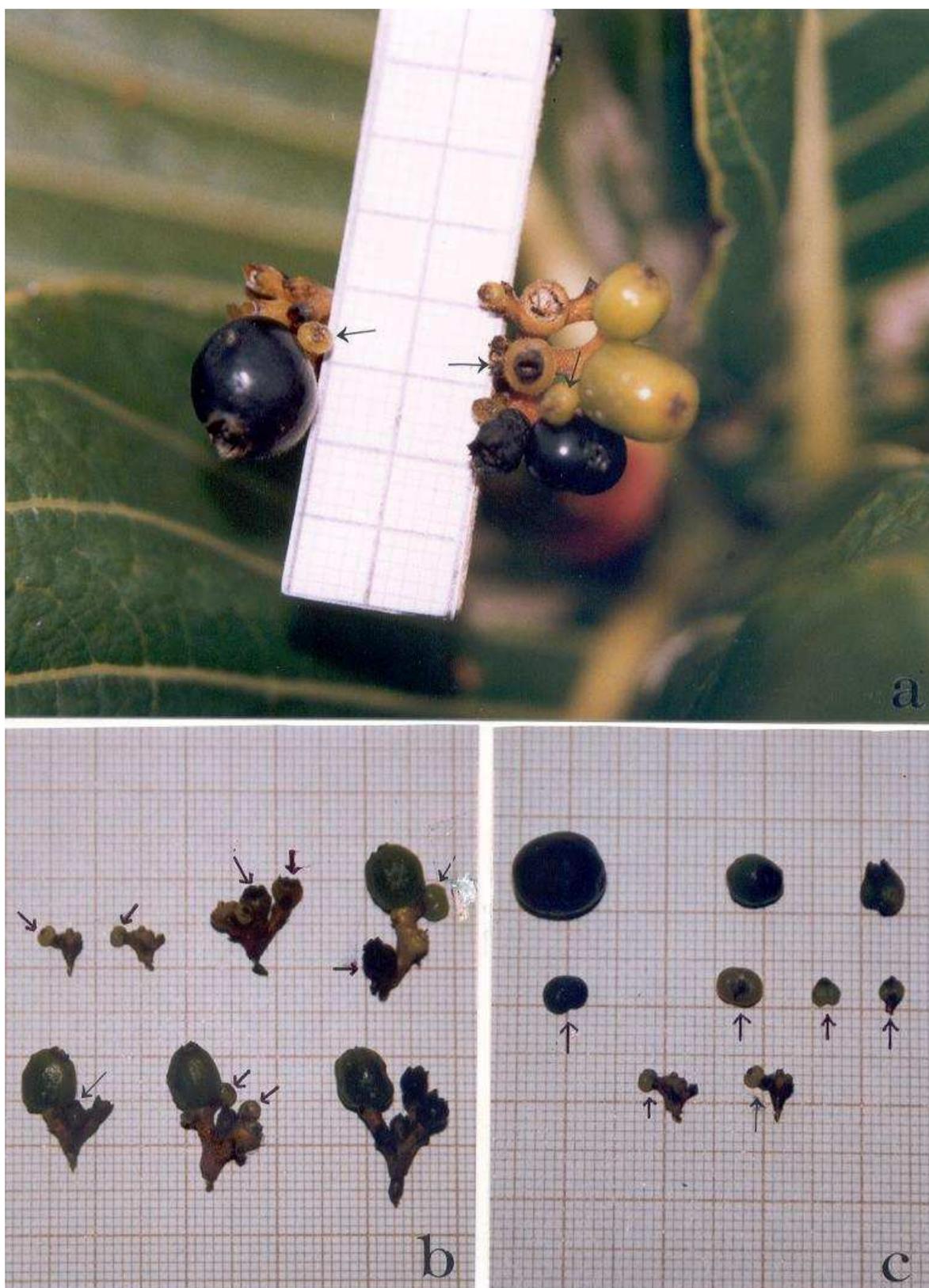


Figura 24 - (a) Frutos normais e partenocárpicos de *Palicourea rigida* em um mesmo ramo. (b) disposição dos dois tipos de frutos na extremidade dos ramos. (c) tamanho dos dois tipos de frutos. As setas indicam os frutos partenocárpicos.

Os dados obtidos da planta longistilada que formou frutos em testes de auto-polinização artificial (planta X) foram comparados com os de outra longistilada (planta Y) (Tabela 10), sua vizinha mais próxima (Figura 10). Observa-se que a eficácia reprodutiva da planta X foi maior que a da planta Y. Na inflorescência ensacada da planta Y (teste de auto-polinização espontânea) não se formou nenhum fruto enquanto que na da planta X formaram-se 66 frutos, sendo 2 de auto-polinização artificial. Do total de sementes examinadas (132), a planta X formou apenas 18% de sementes "normais" e maior quantidade de sementes com alterações em seus constituintes (30% sem embrião; 23% com embrião atrofiado, incluindo poliembrionia; 22% ocas; 6% com embrião bipartido e 1% danificada por insetos). Nas sementes examinadas da planta Y, essas alterações foram comparativamente irrelevantes (9% sem embrião e 2% ocas).

Tabela 10 - Dados coletados durante a GF2, referentes a duas plantas longistiladas da área A (n= número).

Dados	Planta X	Planta Y
Altura	160 cm	155 cm
Cor das flores	alaranjada-amarela	vermelha-alaranjada
Duração da floração	55 dias	63 dias
Número de inflorescências	14	6
Auto-polinização espontânea (sucesso*)	27% (64/237 x 100)	0%
Sementes examinadas (n = 88)	22% normais' 78% alteradas"	
Polinização natural (sucesso*)	50% (873/1739 x 100)	37% (232/631 x 100)
Sementes examinadas (n = 42)	14% normais' 86% alteradas"	89% normais' 11% alteradas"

*total de frutos/ total de flores x 100.

' com endosperma e embrião de aspecto normal.

" com endosperma e/ou embrião ausente ou com tamanho e/ou quantidade não usuais.

4.4. Visitantes florais

As inflorescências e flores de *Palicourea rigida* foram visitadas por seis espécies de beija-flor e por insetos de diferentes ordens, relacionados na Tabela 11 e incluídos em categorias conforme o comportamento manifestado.

O troquilídeo *Colibri serrirostris* (Figura 25, Figura 26a) mostrou comportamento fortemente territorial, expulsando os outros beija-flores que retiravam néctar das flores e estabelecendo-se na área, durante as duas grandes florações. Pelo seu comportamento e fidelidade a *P. rigida* foi considerado polinizador principal. *C. serrirostris* coleta néctar durante todo o dia (6:00 - 18:00 h) em intervalos que variam de 10 a 30 minutos (horas mais quentes do dia), estabelecendo uma linha de forrageamento já que, em geral, visita as plantas em uma mesma sequência. *C. serrirostris* aproxima-se rapidamente da inflorescência e em vôo de libração introduz parte do bico de *ca* 25mm na corola, retirando-o *ca* 2 segundos depois (Figura 25a, b, 26a). Considerando que o comprimento médio de uma corola é *ca* 18 mm e a ponta do bico não atinge a parte basal do tubo corolíneo e sim a língua, o pólen de flores longistiladas adere a *ca* de 7 mm da ponta do bico e o de brevistiladas a *ca* de 12 mm. A cada visita *C. serrirostris* procura as flores abertas naquele dia em todas as inflorescências. Nos intervalos de forrageamento vocaliza muito, pousado em árvores próximas (25c, d), tendo sido observado que passava a língua pelo bico quando havia pólen aderido ao mesmo (Figura 25d). Foi observado algumas vezes visitando *Palicourea officinalis*. Durante a GF1 apenas um indivíduo estabeleceu-se na área A e na GF2 um casal, com linhas de forrageamento diversas.

As outras 5 espécies de beija flor realizaram coletas ocasionais de néctar das flores de *P. rigida* na área A. *Amazilia fimbriata* só foi observada em 1993/94, a espécie não identificada na pequena floração de 1994 e *Antracotorax nigricans*, *Chrysolampis mosquitus* (Figura 26c) e *Thalurania furcata* (Figura 26b) somente em 1994/95. Estes beija-flores foram considerados polinizadores adicionais em função de sua inconstância na área A. Todas as espécies são de pequeno porte, variando de 8,5 (*A. fimbriata*) a 12,0cm (*C. serrirostris*) de comprimento (Sick 1986).



Figura 25 - *Colibri serrirostris*. (a) e (b) coleta de néctar em flores de *Palicourea rigida*. (c) e (d) pouso após forrageamento. A mancha clara no bico indicada pela seta é provavelmente pólen aderido após visita a flores brevistiladas.



Figura 26 - Espécies diferentes de beija-flores coletando néctar em flores de *Palicourea rigida* (mesma inflorescência). (a) *Colibri serrirostris*. (b) *Thalurania furcata*. (c) *Chrysolampis mosquitus*.

Tabela 11 - Visitantes de inflorescências e flores de *P.rigida* e categorias estabelecidas conforme o comportamento observado. As medidas fornecidas são de visitantes que coletaram no interior da corola.

Visitantes	Categoria	Comprimento (mm) aparelho bucal / corpo	
1. Trochilidae (beija-flores)	polinizadores:		
<i>Amazilia fimbriata</i> (Gmelin)	adicional		85 - 110*
<i>Antracotorax nigricans</i> (Vieillot)	adicional		114*
<i>Colibri serrirostris</i> (Vieillot)	principal	25	121*
<i>Chrysolampis mosquitus</i> (Linnaeus)	adicional		92*
<i>Thalurania furcata</i> (Gmelin)	adicional		97*
sp indeterminada	adicional		*(Sick 1986)
2. Hymenoptera			
2.1. Apoidea			
<i>Apis mellifera</i> L.	polinizadores adicionais	3	12
<i>Bombus morio</i> (Swederus)			
operárias	coletoras de pólen	4	17
machos	polinizadores adicionais	6	16
rainha	coletora de néctar	6	26
<i>Epicharis</i> sp	polinizadores adicionais	3	17
<i>Eulaema nigrita</i> Lepeletier	polinizadores adicionais	11	11
<i>Megachile rubricata</i>	polinizadores adicionais	2	12
<i>Pseudaugochloropsis graminea</i> (F)	ladrões de néctar		
<i>Trigona spinipes</i> (F)	ladrões de néctar	2	6
<i>Tetragona clavipes</i> F.	ladrões de néctar e coletores de exsudatos		
<i>Xilocopa cf. hirsutissima</i> (Maidl)	ladrões de néctar	4	23
2.2. Vespoidea			
<i>Polistes erythrocephalus</i> Latreille	coletores de exsudatos		
<i>Polistes subsericeus</i> de Saussure	coletores de exsudatos		
<i>Polybia occidentalis</i> Olivier	ladrões de néctar e coletores de exsudatos		
<i>Polybia paulista</i> R. von Ihering	coletores de exsudatos		
2.3. Scoliidea			
2.3.1. Formicidae			
<i>Acromyrmex</i> sp	predadores de botões florais e corolas		
<i>Camponotus</i> sp1	coletores de exsudatos - policiamento		
<i>Camponotus</i> sp2	coletores de exsudatos - policiamento		
<i>Crematogaster</i> sp	coletores de néctar		
<i>Cryptoceros</i> sp	coletores de exsudatos		
<i>Hypoponera</i> sp	coletores de exsudatos -policiamento		
<i>Pachycondila villosa</i>	coletores de exsudatos -policiamento		
2.3.2. Mutillidae	coletores de exsudatos		
3. Lepidoptera			
3.1. Hesperidae			
<i>Aguna albistria</i> (Plötz)	ladrões de néctar- polinizadores adicionais		
sp1	polinizadores adicionais	7	
sp2	polinizadores adicionais		
sp3	polinizadores adicionais		
sp4	polinizadores adicionais	11	
3.2. Pieridae			
sp1	ladrões de néctar - coletores de exsudatos		
3.3. Spingidae			
<i>Aellopus</i> sp	polinizadores adicionais		
<i>Aellopus fadus</i> (Cramer)	polinizadores adicionais	17	
4. Coleoptera			
4.1. Chrysomelidae	predadores de botões florais e corolas		
4.2. Curculionidae	predadores de botões florais e corolas		
4.3. Staphylinidae	ladrões de néctar e pólen		
5. Diptera - Sarcophagidae	ladrões de néctar - coletores de exsudatos		
6. Hemiptera -			
6.1. Alydidae			
<i>Megalotomus pollescens</i> (Stol)	predadores de corolas		
6.2. Pentatomidae			
<i>Acrosternum</i> sp	predadores de frutos e sugadores de seiva		
forma imatura	sugador de seiva		
7. Ortoptera			
- forma imatura	predadores de corolas		
Blattaria - Blattellidae	ladrões de pólen e néctar		

As abelhas foram visitantes constantes, como coletoras de néctar e/ou pólen. Aquelas cujo comportamento e tamanho possibilitou um eventual contato diferenciado com anteras e estigmas foram consideradas polinizadores adicionais. Em geral, sobrevoavam as inflorescências em círculos, aproximando-se e distanciando-se antes do pouso. A retirada de néctar foi feita de várias formas: **a)** *Xilocopa* cf *hirsutissima*, *Apis mellifera* (Figura 27a), *Megachile rubricata* e *Trigona spinipes* introduziam parcialmente o corpo na corola; **b)** rainha e machos de *Bombus morio* (Figura 27b) e *Epicharis* sp agarravam o tubo corolíneo com as patas e inseriam a língua e a cabeça; **c)** os machos de *Eulaema nigrita* agarravam a corola, mas inseriam apenas o aparelho bucal. A pilhagem de néctar pela parte externa da giba era feita por meio da abertura de buracos (*T. spinipes*, *Tetragona clavipes*), de furos (*Pseudaugochloropsis graminea*) ou utilizando furos já existentes na corola (*T. spinipes*, *X. cf hirsutissima*, *A. mellifera*). O exame dos corpos da maioria dos espécimes coletados revelou quantidade irrisória de grãos de pólen, com exceção das operárias de *Bombus morio*. Estas apresentaram muito pólen aderido aos pelos do dorso e acumulado nas corbículas (3 espécimes examinados), formando uma massa aparentemente homogênea. Como as operárias de *Bombus morio* realizavam visitas intercaladas a *P. rigida*, *P. officinalis* e *P. coriacea*, espécies que florescem simultaneamente, em função da semelhança morfológica entre o pólen das três espécies, não foi possível afirmar que se tratava de um carregamento puro de pólen. Este comportamento foi registrado também para as outras abelhas, com exceção de *T. spinipes* e *T. clavipes* que permaneciam em uma ou mais plantas próximas de *P. rigida* durante vários dias. O comprimento da língua e do corpo das abelhas que coletaram pólen ou néctar através da abertura da corola está na Tabela 11 para caracterizá-las. A rainha de *B. morio*, em função de seu tamanho, danifica todas as corolas das flores que visita, rasgando-as longitudinalmente no lado abaxial.

As visitas de mariposas e borboletas foram ocasionais e sazonais, sendo consideradas, em geral, como polinizadores adicionais. A única espécie que realizou visitas constantes foi *Aellopus fadus*, presente na área A, durante os meses de dezembro/1994 e janeiro/1995. Os representantes dessa espécie não pousam nas inflorescências, desenrolando a longa probóscide (ca 17mm) em vôo de libração semelhante ao dos beija flores, tocando a flor com a cabeça (Figura 28a). Nos primeiros dias em que foram vistos na área, *C. serrirostris* exibiu comportamento agressivo



Figura 27 - Coleta de néctar em *Palicourea rigida* por abelhas. (a) *Bombus morio*. (b) *Apis mellifera*.

afastando-os apenas temporariamente. Espécimes de *A. fadus* foram observados visitando até 6 inflorescências de uma mesma planta e coletando néctar de cerca de 30 flores, demorando aproximadamente 5 segundos em cada e retornando à flores anteriormente visitadas. As outras mariposas e borboletas observadas (Hesperiidae, Pieridae -Figura 28b e Sphingidae -Figura 28c) pousavam lateralmente nas flores, agarrando-se com as patas ao tubo corolíneo e inserindo a probóscide e a cabeça para coletar néctar. Algumas vezes pousaram em inflorescências ensacadas, tentando sugar o néctar de flores próximas à parede dos sacos, através da tela. Também foram vistas encostando a probóscide em discos de flores recém-caídas. A quantidade de grãos de pólen aderidos à probóscide e/ou à cabeça desses lepidópteros é irrelevante (ca 6 grãos por indivíduo), talvez porque ao enrolar e desenrolar a probóscide a maior parte dos grãos de pólen caia. As formigas, frequentes nas inflorescências, foram observadas em constante deslocamento pelas hastes das inflorescências, em atitudes de “policiamento”, como *Pachycondilla villosa*, *Hypoponeura* sp e *Camponotus* sp 1 e sp 2 que assumem posturas agressivas com a aproximação de insetos como vespas, moscas e abelhas, e conseguem afastá-los temporariamente. Esse comportamento foi observado também sobre frutos verdes e maduros (*Camponotus* sp 2). A maioria delas recolhe exsudatos da parte externa da corola de flores, em pré-antese e recém-abertas, e do disco nectarífero de flores que já sofreram abscisão (*Cryptoceros* sp e as espécies anteriormente citadas). Formigas pequenas (*Crematogaster* sp) adentram as corolas, indo até a base onde está o néctar e lá permanecem em grupos. Outras (*Acromyrmex* sp) cortam flores e botões, carregando-os até o formigueiro e deixando as inflorescências com as hastes nuas (Figura 29a). Não se observou deslocamento de formigas de uma planta para outra e tampouco foram encontrados grãos de pólen aderidos ao corpo dos espécimes coletados. Uma formiga-feiticeira fêmea (Mutillidae) também foi observada rastreando os discos de néctar.



Figura 28 - Coleta de néctar em *Palicourea rigida* por lepidópteros. (a) *Aellopus fadus* (Sphingidae). (b) Pieridae. (c) Hesperíidae.

As vespas são visitantes constantes, movimentando-se entre as flores e discos nectaríferos, passando as vezes períodos superiores a 10 minutos inserindo o aparelho bucal em todos os discos de uma inflorescência (Figura 29b), incluindo os de frutos imaturos. Algumas se interessam pela parte externa das corolas de flores abertas, especialmente pela base gibosa onde, ao encontrar furos, introduzem o aparelho bucal a procura de néctar (*Polybia paulista* e *Polister subsericeus*). Somente um espécime de *Polybia occidentalis* foi observado furando a base da corola para retirada de néctar. Ao se aproximarem das inflorescências as vespas nunca pousam sobre flores abertas ou adentram a flor.

Coleópteros (besouros) da família *Chrysomelidae* e *Curculionidae* abrigam-se nas inflorescências para copular e se alimentar, danificando pedicelos, corolas e frutos jovens. Em vista disso foram considerados “predadores”. É comum encontrar, no interior do tubo corolíneo, ovos e pequenas ninfas esbranquiçadas que podem ser de pequenos coleópteros da família Staphylinidae já que foi encontrado grande quantidade de adultos dessa família dentro das corolas de algumas plantas. As flores com estafilinídeos, mesmo quando recém abertas, não possuíam pólen nas anteras, possivelmente por ter sido coletado para fins nutritivos.

Hemípteros (perceijos) do gênero *Acrosternum* (Figura 29c) são encontrados com frequência furando os frutos imaturos, o que lhes dá um aspecto granuloso característico. Já *Megalotomus pollescens* foi observado danificando corolas. Algumas formas imaturas da ordem Orthoptera também foram vistas se alimentando de corolas.

Moscas de variados tamanhos, pertencentes à família Sarcophagidae (Figura 29d), também são coletoras dos exsudatos florais, deslocando-se pelos discos de néctar e rastreando-os com a probóscide. É comum encontrar muitas moscas em plantas onde *Trigona spinipes* está furando as corolas na altura da giba para pilhagem de néctar. As moscas caminham pelas flores e inserem a probóscide nos furos para retirada de néctar. Apenas uma mosca foi vista inserindo a cabeça na corola, porém não foram encontrados grãos de pólen em seu corpo.

Baratas da família Blattellidae são vistas com frequência em constante deslocamento nas inflorescências, sobre os discos nectaríferos, frutos e entrando nas corolas. Foram encontrados até 10 espécimes em uma única inflorescência mas sem grãos de pólen no corpo. Em plantas onde a presença destes insetos era marcante, as flores abertas praticamente não continham pólen, possivelmente porque o mesmo era utilizado como alimento. Sua presença na área A foi intermitente.

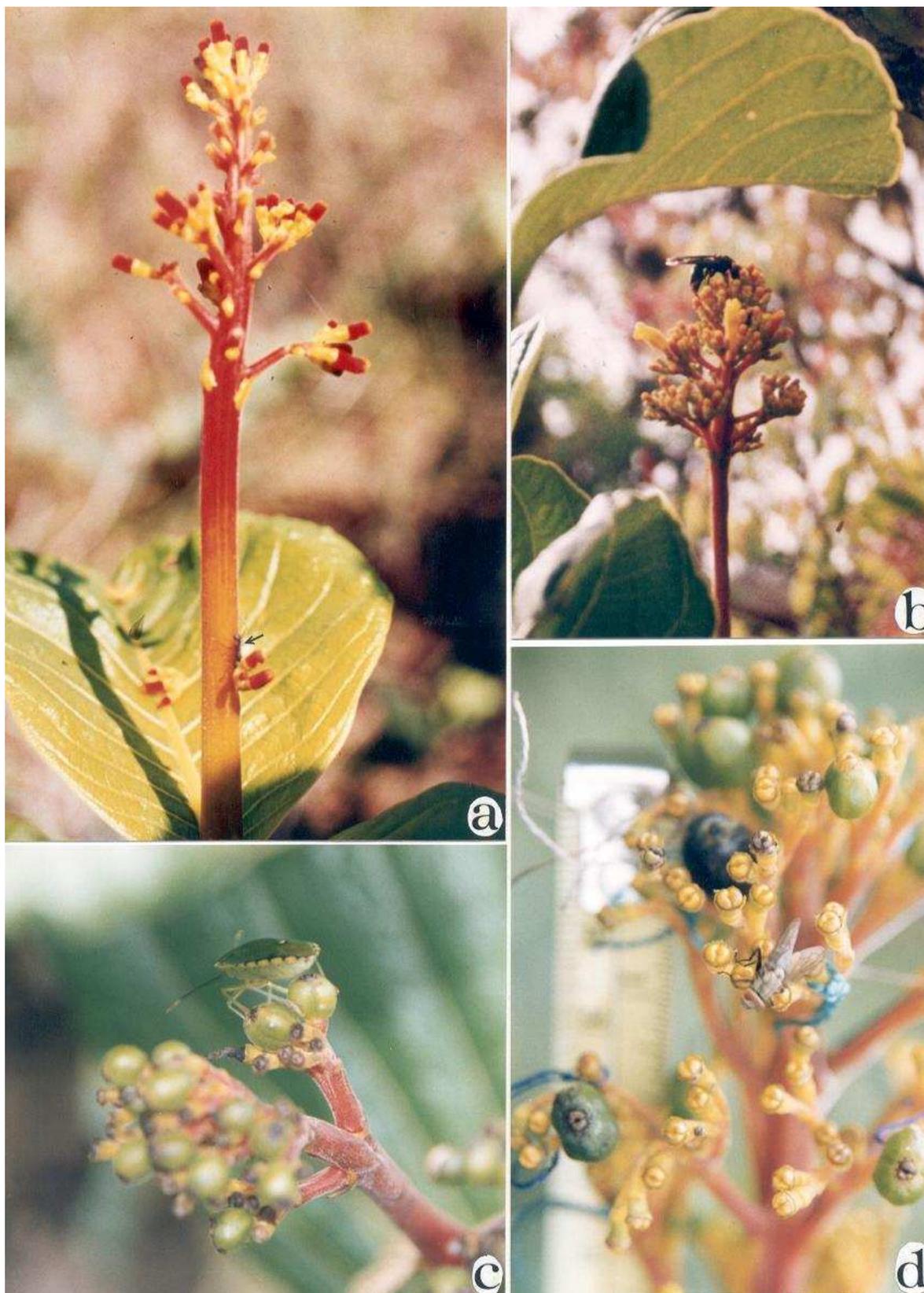


Figura 29 - *Palicourea rigida*. (a) formiga *Acromyrmex* sp carregando botões florais recém-cortados. (b) vespa *Polistes subsericeus* coletando exsudatos em discos nectaríferos. (c) percevejo *Acrosternum* sp sobre frutos. (d) mosca Sarcophagidae sobre discos nectaríferos.

5. DISCUSSÃO

5.1. Ocorrência e Fenologia.

O padrão de floração de *P. rigida* foi associado ao que Bawa (1983) caracterizou genericamente como “floração extensiva”, com pequena produção diária individual de flores e duração de várias semanas a vários meses, podendo resultar em uma floração mais ou menos contínua durante o ano. Gentry (1974) descreveu cinco tipos fenológicos para espécies de Bignoniáceas temperadas e da América Central. O padrão observado para *P. rigida* mais se aproxima do tipo “cornucópia”, caracterizado pela produção de grande número de flores durante várias semanas. Se considerarmos a nível populacional, como as plantas de *P. rigida* florescem sincronicamente, as diferenças em relação ao padrão “cornucópia” são na longa duração da floração (ca de três meses) por período e na ocorrência de duas florações anuais. Se considerarmos a nível individual, a produção diária de flores é relativamente pequena (ca 5 flores por inflorescência) e extensa (ca 60 dias). Portanto, é preferível utilizar o termo genérico “floração extensiva”. Os dados obtidos de exsiccatas mostram que, no DF, até 1993 só não havia coletas de plantas de *P. rigida* floridas no mês de junho. Este fato, aliado aos dados obtidos neste trabalho referentes à PF (maio, junho e julho de 1994) permite afirmar que é possível encontrar, no DF, representantes desta espécie floridos, em qualquer época do ano.

Verificou-se que os eventos fenológicos de *Palicourea rigida* estão relacionados com o regime de chuvas e alterações climáticas associadas, já que os períodos de intensa floração só começaram aproximadamente um mês após o início da estação chuvosa. Isto também foi registrado em áreas de cerrado em São Paulo, por Saraiva *et al.* (1988 *apud* Barros 1992) que constataram que a maioria das espécies floresce na estação chuvosa, refletindo uma adaptação às condições climáticas. Em função da sincronia inter e intra-populacional observada e da grande quantidade de plantas envolvidas nos períodos de grande floração (GF1 e GF2), o principal período reprodutivo de *P. rigida* ocorre durante a estação chuvosa.

Os dois ciclos anuais de floração com intensidades diferentes observados em *P. rigida* foram registrados também para *Palicourea officinalis* (S.L.O. Macedo, com. pessoal), *Psychotria leiocarpa* e outras espécies do gênero (Lima 1986, Ormond *et al.*

1986). Como *Palicourea* e *Psychotria* são gêneros afins, é provável que tenham desenvolvido estratégias de floração similares para atração e manutenção dos agentes de polinização e dispersão, durante a maior parte do ano.

Durante a PF (estação seca), a pequena quantidade de plantas floridas, flores e frutos produzidos pode estar associada às condições climáticas. A não ocorrência de anteses florais a partir de julho de 1994 coincide com a ausência de chuvas, queda da umidade e da temperatura média do ar, e o aumento nas horas de insolação verificadas neste mês. Isto poderia provocar perda de turgescência nos tecidos florais, necessária à abertura dos lobos da corola e criar, nas flores “fechadas”, um micro-ambiente com umidade e temperatura favoráveis à deiscência das anteras.

5.1.1. Sistema subterrâneo e propagação vegetativa

Os registros da ocorrência de brotos a partir do sistema subterrâneo de plantas de *P. rigida* que perderam a parte aérea, podem evidenciar uma capacidade de regeneração da parte perdida, provavelmente a partir da região de transição caule-raiz. Fatos semelhantes são associados com a presença de órgãos subterrâneos conspícuos, adaptados à ocorrência de fogo (Rawistcher & Rachid 1946). Já no único caso verificado de brotos a partir de raízes superficiais paralelas ao solo, tem-se um indicativo de propagação vegetativa por meio de raízes gemíferas. Entretanto, este registro foi feito em local anteriormente escavado, fato que aliado à ocorrência de fogo na área pode ter causado injúrias às raízes e assim desencadeado o processo de emissão de brotos. Raju *et al.* (1966) para casos similares, diz tratar-se de brotação a partir de “gemas reparativas”, diferenciando-as das gemas adventícias que são produzidas em raízes de sistemas não perturbados. Para elucidação dos componentes estruturais do sistema subterrâneo de *P. rigida* sugere-se que sejam feitos estudos anatômicos.

O sistema subterrâneo observado, sem ligações entre as plantas próximas, não evidenciou o predomínio de propagação vegetativa, possível explicação para a anisopleitia. Entretanto, vale ressaltar que Henriques (1993), em 23 escavações realizadas, encontrou 3 ligações entre o sistema radicular de plantas próximas de *P. rigida*, incluindo-a entre as espécies de cerrado que apresentam propagação vegetativa. Em seus estudos, Henriques (*l.c.*) conclui que a reprodução vegetativa ocorre na maioria das espécies de cerrado (59%),

variando quanto à forma e intensidade e constituindo-se em uma importante adaptação, que permite a sobrevivência da espécie em períodos desfavoráveis ao recrutamento via semente. No gênero *Populus* os brotos de raízes, semelhantes aos aqui relatados para *P. rigida*, podem sofrer desligamento após o desenvolvimento de um sistema radicular próprio, o que resulta em baixo índice de ligações subterrâneas no decorrer do tempo (Grant 1981). Estudos genéticos utilizando marcadores moleculares poderiam indicar se existem clones de plantas longistiladas de *P. rigida* dentro de uma população, ressaltando assim a ocorrência de propagação vegetativa como causa da anisopletia. Caso contrário, o predomínio de morfas longistiladas de *P. rigida* na população reprodutiva da área A pode decorrer de uma maior plasticidade fenotípica em relação à outra morfa, permitindo maior sucesso no estabelecimento das plântulas como verificado em *Anchusa officinalis* (McKenna 1985) ou por uma tendência à quebra da auto-incompatibilidade (Ganders 1979a), que ocasionaria excesso de indivíduos longistilados por autogamia.

5.2. Biologia floral.

5.2.1. Eventos florais e polinização.

Palicourea rigida não possui flores com odor perceptível mas apresenta variabilidade cromática, das hastes das inflorescências até os verticilos florais internos, o que compõe um conjunto visualmente atraente. A própria variabilidade individual dentro de uma população pode ter um importante papel na atração de polinizadores pelo conjunto apresentado, aumentando as chances de polinização cruzada, já que a floração é sincrônica e isto pode estimular o deslocamento dos animais entre as plantas. Até a cor amarela dos discos nectaríferos persistentes após a queda das corolas em contraste com a coloração do hipântio ajuda a compor o conjunto de atrativos visuais.

Dentre as síndromes de polinização propostas por Faegri & Van der Pijl (1971) as flores de *P. rigida*, tubulosas com lobos livres, dilatação basal para acúmulo de néctar, parede corolínea espessa, antese diurna, não odoríferas, coloração conspícua, nectaríferas, sem guia de néctar, apresentam um conjunto de características que mais se aproximam da ornitofilia. A pequena quantidade de néctar produzida em cada flor seria uma estratégia para que os polinizadores, que necessitam de maiores quantidades de recompensas calóricas, não se saciem após visitas em única planta, incrementando assim a polinização

cruzada. Heinrich & Raven (1972 *apud* Waser 1983) propuseram que as recompensas florais devem ser ricas o suficiente para sustentar o metabolismo dos polinizadores mas não o necessário para saciá-los, conservando-os assim em movimento entre as plantas da mesma espécie. As principais diferenças entre a ornitofilia e a psicofilia (polinização por lepidópteros diurnos) são a presença de odor e a fragilidade da parede da corola de flores psicófilas (Faegri & Van der Pijl 1971). No entanto é temerário assumir que em função de uma síndrome de características morfológicas, uma planta tenha apenas um tipo de polinizador (Baker 1983), já que outros animais também realizam visitas que podem resultar em eventual polinização. *P. rigida*, apesar de ser uma espécie ornitófila, recebeu, além das visitas de beija-flores, as de outros possíveis vetores de pólen como abelhas e lepidópteros.

Os tricomas encontrados na parede externa da corola são nectários circunflorais (Rico-Gray 1989) tricomáticos (Vogel 1977 *apud* Weberling 1992). Sua secreção, conforme Frey-Wyssling (1935 *apud* Weberling 1992), pode ser eliminada diretamente através da parede externa cutinizada das células, por meio de finos canais secretores ou por laceração (ou retirada) da cutícula. Como não foram observados canais secretores ou partes danificadas nos tricomas das corolas de *P. rigida* examinadas, acredita-se que a secreção contida na célula apical seja eliminada por exudação através de sua parede cutinizada. Isto mantém a corola sempre umidificada e atrai potenciais ladrões de néctar, como moscas, abelhas de pequeno porte como *Trigona spinipes* e vespas, que passam a não se interessar pela parte interna do tubo floral e pelo néctar lá produzido. Os tricomas podem estar funcionando também como atrativo para formigas, visto que cinco das oito espécies observadas exibiram comportamento de “policiamento” (defesa), expulsando outros insetos visitantes. Rico-Gray (1989) reitera a importância da interação mutualística existente entre plantas que possuem nectários extra-florais e formigas que as defendem de outros insetos. Este mesmo autor apresenta estudos com a orquídea *Schomburgkia tibicinis*, que possui nectários circunflorais, e registra diminuição de ataques à planta por besouros em função da presença de formigas.

O néctar produzido pelo disco nectarífero e acumulado na base gibosa das corolas de *P. rigida*, contém sacarose em concentrações que variam de 18,5 a 21,6 %, faixa que, conforme proposição de Pyke & Waser (1981), caracterizaria flores polinizadas por morcegos (18,9%) e esfingídeos (22,1%), já que para beija-flores a média de concentração

é um pouco mais alta (25,4%) e abelhas preferem néctar concentrado (41,6%). Morcegos polinizam flores de antese noturna e esfingídeos não foram constantes durante toda a floração. Além disto, estas porcentagens representam valores médios, sabendo-se que a variabilidade interespecífica na quantidade de néctar produzido e na concentração de açúcares é grande (Baker & Baker 1983, Feinsinger 1983) e sujeita a influências ambientais (Gottsberger 1986). Vale ressaltar que os beija-flores também se alimentam de insetos (Baker & Baker 1983, Sick 1986) que, no caso de *P. rigida*, são encontrados frequentemente no interior das corolas (formigas, estafilínídeos e larvas), podendo ser capturados durante a coleta de néctar e complementar a dieta calórica dos polinizadores.

O grau de heterostilia morfológica encontrado para *P. rigida* (em torno de 0,30) é médio se considerarmos que varia de 0 para plantas homostilas a 0,60 para plantas fortemente heterostílicas (Eiten 1963). Para Barrett & Shore (1987), quanto mais intensa a hercogamia (separação espacial entre anteras e estigma), maior é a ocorrência de cruzamentos intermórficos.

O deslocamento dos filetes e estilete assumindo posicionamento diverso nas duas morfais durante a antese foi observado também em *Psychotria leiocarpa* (Lima 1986), tratando-se de uma estratégia para assegurar a coleta e deposição eficiente de pólen durante a visita do polinizador. Nas flores longistiladas, a posição central das anteras, em torno do estilete e com as tecas voltadas para baixo, reduz a luz do tubo corolíneo, fazendo com que o pólen seja depositado na ponta do bico do polinizador quando este já coletou néctar e o está retirando da flor, diminuindo as perdas. A deposição de pólen no estigma em **T**, de longistiladas, ocorre durante a coleta de néctar com o pólen proveniente de outra flor aderido ao bico. Nas flores brevistiladas, o anteparo formado pelas anteras faz com que uma placa de pólen seja depositada na parte superior proximal do bico do polinizador. O estigma em **V**, de brevistiladas, recebe pólen aderido a ponta do bico durante a coleta de néctar. O dimorfismo estigmático de tamanho, relatado pela primeira vez para duas espécies do gênero *Palicourea* por Sobrevila *et al.* (1983), tem um papel decisivo na polinização. Os ramos longos e estreitos do estigma de brevistiladas não obstruem o acesso ao néctar e não se tornam congestionados com o auto-pólen, enquanto a forma compacta do estigma de longistiladas que, sendo exserto não recebe seu próprio pólen, é mais eficiente, funcionando como uma esponja ao recolher o pólen aderido ao bico do polinizador.

Além da frequência e fidelidade os beija-flores foram considerados polinizadores principais (*Colibri serrirostris*) em função da apresentação do pólen, visto ser pouco provável que aparelhos bucais de menor calibre e rigidez possam ser tão eficientes na retirada e deposição de pólen quanto o bico de um beija-flor. As outras espécies de beija-flores foram consideradas polinizadores adicionais por realizarem visitas esporádicas mas possuírem características que lhes permitem realizar polinizações. Algumas abelhas e lepidópteros também foram enquadrados nesta categoria porque, apesar de promíscuos, em determinados períodos foram visitantes frequentes, podendo ter realizado eventuais polinizações efetivas, transferindo pólen aderido aos pelos do corpo e probóscide, principalmente no caso de *Aellopus fadus*.

5.2.1.1. Pólen

A substância coesiva, de natureza lipídica, que envolve os grãos de pólen tem papel de suma importância na adesão adequada dos grãos de pólen ao aparelho bucal dos polinizadores. A ausência de características visivelmente distintas entre os grãos das duas morfais impediu a identificação dos carregamentos de pólen encontrados nos estigmas de flores polinizadas naturalmente e no corpo dos visitantes. Também não foi possível diferenciar entre si os grãos de pólen de *P. rigida*, *P. coriacea* e *P. officinalis* (em microscópio óptico), espécies simpátricas que florescem simultaneamente e têm visitantes em comum.

Salgado-Laboriau (1971) não registra *P. rigida* como espécie heterostílica e apresenta, para os grãos de pólen, diâmetro de *ca* 54 μm , valor médio aqui registrado para brevistiladas e incluso na faixa abrangida pelo desvio padrão do valor médio de longistiladas. Apesar dos grãos de pólen das duas morfais, a olho nú e sob microscópio óptico, serem iguais (Silva *et al.* 1995), o teste *t* aplicado às medidas obtidas através do MEV indica que as flores brevistiladas produzem pólen de diâmetro significativamente maior o que, em geral, está associado a uma menor produção de grãos. Esta diferença de produção de pólen entre as morfais não foi evidenciada como significativa para *P. rigida* (teste *t*). Dimorfismo no tamanho do pólen é considerado como uma das características mais comuns para heterostilia (Dulberger 1992), aliado às diferenças na quantidade de pólen produzido (Barros 1989, McKenna 1992).

A razão entre o diâmetro do pólen de brevistiladas e o de longistiladas para *P. rigida* é 1,06, valor igual ao calculado para *Oldenlandia scopulorum* (Rubiaceae), o menor entre os listados por Dulberger (*l.c.*) para espécies distílicas. Esta diferença é justificada pelo fato de que a distância a ser percorrida pelos tubos polínicos entre o estigma e o ovário de flores longistiladas é maior que em brevistiladas (Lewis 1979), exigindo maior quantidade de reservas. Evidencia-se assim uma adaptação para o cruzamento intermórfico, verificada também nos testes de germinação com a formação de tubos polínicos de brevistiladas *ca* duas vezes maiores que os de longistiladas. A frequente associação de grãos de pólen de diferentes diâmetros com estigmas com variação no tamanho e disposição das papilas (Richards & Barrett 1992) não foi estabelecida para *P. rigida*. Existem indicativos, por meio de uma observação ao MEV, de que as papilas estigmáticas de flores longistiladas possam ter menor diâmetro e tamanho variado enquanto as de brevistiladas sejam maiores e regulares. Isto pode evidenciar adaptação para melhor adesão de grãos de pólen provenientes da outra morfa, porém estudos complementares utilizando microscopia eletrônica de varredura são necessários para que se estabeleçam relações conclusivas.

Apesar da frequente associação de heterostilia com dimorfismo polínico de tamanho e de escultura da exina, existem registros de pólen morfológicamente igual para as morfais de *Palicourea lasiorrachis* (Feinsinger & Busby 1987) e para outras 9 espécies de Rubiaceae (Bir Bahadur 1968). Entretanto, Bir Bahadur (*l.c.*) lista 39 espécies de Rubiaceae com dimorfismo polínico, mas não apresenta o grau de variabilidade e as diferenças no tamanho dos grãos chegam a ser de apenas 1µm entre as morfais (*Mussaenda elegans*). Isto pode indicar a existência de maior número de espécies de Rubiaceae sem dimorfismo significativo no tamanho do pólen.

A quantidade de pólen produzido em cada flor de *P. rigida* (*ca* 2600 grãos) representa um investimento da espécie em polinização cruzada já que possui apenas dois óvulos por flor. Cruden (1977) estabelece que são necessários de dois a seis grãos de pólen desenvolvendo-se no estigma, para cada óvulo existente, a fim de assegurar uma formação de frutos relativamente alta. Sendo assim, a quantidade de grãos de pólen produzida por uma flor de *P. rigida*, seria suficiente para a polinização de cerca de quinhentas flores, desconsiderando as perdas que ocorrem durante o processo. Trata-se portanto, de mais uma estratégia da espécie para assegurar a xenogamia.

A principal recompensa oferecida por *P. rigida* a seus polinizadores é o néctar mas alguns visitantes como as operárias de *Bombus morio* coletam pólen ativamente. Em relação ao valor nutritivo dos grãos de pólen, Baker & Baker (1979) defendem que himenópteros e dípteros, que utilizam pólen em sua nutrição, selecionam pólen com conteúdo lipídico, de maior valor energético. A presença de amido em grãos de pólen seria uma característica de flores anemófilas ou polinizadas por animais que não utilizam pólen como alimento, como pássaros e lepidópteros. Além de ter sido evidenciada a presença de amido no interior de grãos de pólen de *P. rigida*, encontrou-se lípidios apenas como envoltório dos mesmos. Segundo Baker (*apud* Lima 1986), a função do amido é a de prover energia para o crescimento do tubo polínico e fornecer unidades de glicose para formação de celulose e calose. *Psychotria leiocarpa* e *Psychotria nuda* apresentam amido nos grãos de pólen das duas morfais (Lima 1986) como *P. rigida*. Todavia, Ornduff (1975 *apud* Lima 1986) registrou a presença de amido apenas em morfais brevistiladas de *Hypericum aegypticum* (Clusiaceae) e *Hedyotis caerulea* (Rubiaceae), o que pode refletir uma adaptação à necessidade de formar tubos polínicos que percorram a distância entre o estigma e o ovário de longistiladas, que é maior do que a de brevistiladas.

Os resultados contraditórios do teste para viabilidade dos grãos de pólen (Alexander *apud* Dafni 1992) podem resultar de alterações de pH, não mensuradas (Dafni 1992) ou de pólen que, apesar de possuir estruturas íntegras, perdeu sua germinabilidade. Esta perda rápida da capacidade de germinação pode estar adaptada ao comportamento do polinizador, pois os beija-flores limpam o bico nos intervalos de forrageamento, o que significa que a transferência de pólen das anteras para o estigma deve ocorrer durante cada período de coleta de néctar.

A adição de estigmas ou extrato deles a soluções nutritivas para germinação de pólen é indicada para detectar estímulos químicos ao crescimento de tubos polínicos e induzir respostas trópicas (Stanley & Linskens 1974). Quanto à produção de substâncias na superfície estigmática que tenham efeito inibidor sobre a germinação, Franklin-Tong *et al.* (1988), em bioensaios com *Papaver rhoeas* L., espécie com auto-incompatibilidade gametofítica, concluem que os estigmas não produzem inibidores difusíveis. Isto poderia explicar porque a adição de estigmas de *P. rigida* ao meio, foi inadequada em detectar algum tipo de estímulo proveniente dos estigmas de uma morfa em relação ao pólen da outra. Além disso, em testes realizados no campo, mesmo com cuidados operacionais para

evitar mistura do pólen, a probabilidade de adicionar ao meio estigmas que contenham grãos de pólen é grande, já que estes se confundem facilmente com as papilas do estigma.

Os testes de germinação indicam boa capacidade germinativa para grãos de pólen quando em substrato adequado logo após sua retirada das anteras. É interessante notar que, com a presença de estigmas de flores brevistiladas em pré-antese, houve redução na quantidade de tubos polínicos formados a partir de pólen de longistiladas. Este fato pode estar relacionado com a pequena diferença temporal observada para o início do período receptivo dos estigmas (pré-antese para longistiladas e pós-antese para brevistiladas) e alterações químicas decorrentes.

5.3. Biologia reprodutiva

5.3.1. Sistema reprodutivo

Os testes experimentais de polinização permitem afirmar que *Palicourea rigida* possui incompatibilidade heteromórfica, ou seja, somente cruzamentos intermórficos (legítimos) resultam em formação de frutos com sementes de aspecto viável. A razão pólen-óvulo calculada (Cruden 1977) também evidenciou *P. rigida* como espécie xenogâmica.

Os testes para verificação de agamospermia foram negativos, não havendo formação de frutos apomíticos. Entretanto, algumas espécies apresentam pseudogamia na qual a polinização é necessária para a formação da semente, mas o embrião tem a constituição genética da planta mãe, não sendo formado por fusão de gametas (Briggs & Walters 1990). Neste caso, emasculações não são suficientes para detectar a ocorrência de apomixia, sendo necessários estudos citológicos de sementes em germinação como para *Eriotheca pubescens* (Oliveira *et al.* 1992), que não formou frutos em testes para agamospermia mas apresentou poliembrionia, indicando ocorrência de apomixia.

O sucesso na formação de frutos em inflorescências ensacadas para verificação de autopolinização espontânea, foi muito inferior ao de cruzamentos legítimos e de polinização natural. Pode ser resultante de contaminação eventual com pólen de outras plantas, devido a contato esporádico com insetos. A formação desses frutos foi associada aos registros de falhas na vedação junto a haste da inflorescência e/ou nas emendas laterais

que permitiu a penetração de baratas e besouros. Os sacos para isolamento das inflorescências foram confeccionados com tela de plástico por se tratar de um material resistente, que provoca pequenos aumentos de temperatura (Cruden & Hermann 1983), além de propiciar uma boa camuflagem, haja visto que os beija-flores, considerados como principais polinizadores, frequentemente os utilizaram para pouso.

A auto-incompatibilidade de *P. rigida* foi confirmada nas observações ao microscópio de fluorescência, dos estiletos previamente auto-polinizados, já que nenhum tubo polínico atingiu a parte basal do estilete. Os locais de rejeição ao auto-pólen variou com as morfais, verificando-se maior inibição ao crescimento de tubos polínicos em estigmas de flores brevistiladas, nos quais, em geral, não há penetração além da camada superficial das papilas. Da mesma forma, Barros (1989) relata para *Erythroxylum suberosum* e *Erythroxylum tortuosum*, espécies distílicas, rejeição ao auto-pólen na superfície estigmática de brevistiladas e ao longo do estilete de longistiladas. Variação no local de reconhecimento do pólen incompatível foi observada também por Bawa & Beach (1983) em 7 espécies distílicas de Rubiáceas lenhosas da Costa Rica, cujas morfais brevistiladas mostraram rejeição estigmática e morfais longistiladas rejeição estilar. Esta última reação, também variou em relação à presença de auto-pólen e de pólen intramórfico (*Cephaelis elata*, *Coussarea* sp1467, *Psychotria chiapensis*) e quanto à região: junção estigma-estilete (*Psychotria suerrensensis*), porção média (*Psychotria officinallis*) ou basal do estilete (*Rudgea cornifolia* e *Coussarea* sp1424).

Para casos de auto-incompatibilidade esporofítica, Mattsson *et al.*(1974) sugerem que a película proteica que recobre o estigma seja o local de ocorrência das reações de reconhecimento de pólen, envolvidas nas questões de incompatibilidade. Por outro lado, Eleman & Dickinson (1990) sugerem que, em *Brassica oleracea*, mudanças estruturais na cobertura do pólen e parede pecto-celulósica do estigma só ocorrem em polinizações compatíveis, favorecendo a penetração dos tubos polínicos. Na espécie distílica *Linum hirsutum* Murray (1986) observou que, apesar de alguns tubos crescerem até o topo do ovário, nenhuma semente se forma e a maioria dos tubos é inibida no topo do estilete. Gibbs (1990) afirma que o local das reações de auto-incompatibilidade pode variar também entre as morfais de espécies distílicas, sendo que em autopolinização, a rejeição estigmática é mais comum entre brevistiladas. Pode-se considerar então que *P. rigida* comporta-se da

forma usual, com rejeição ao auto-pólen no estigma de brevistilas e na porção inferior do estilete de longistilas.

Em cruzamentos ilegítimos constatou-se que na GF1 não houve formação de frutos e na GF2 apenas um fruto formado em uma planta longistilada, podendo ser resultante de contaminação durante o manuseio. Nas preparações com estiletes pré-polinizados verificou-se rejeição ao pólen da mesma morfa de modo semelhante ao relatado para autopolinizações, reforçando para *P. rigida* a ocorrência de incompatibilidade intramórfica, característica de plantas heterostílicas.

Verificou-se eficácia reprodutiva diferencial para a morfa longistilada nos dois grandes períodos de floração. A produção de frutos aumentou no segundo período ao passo que o número de inflorescências formadas diminuiu. A quantidade de flores abertas por dia por inflorescência também foi menor em GF2. Conseqüentemente a quantidade de pólen proveniente de outras flores da mesma planta (geitonogâmico) deve ter diminuído, não havendo saturação dos estigmas e estiletes com pólen e tubos polínicos incompatíveis. Jong *et al.*(1992), em pesquisa com *Ipomopsis aggregata*, relacionaram a maior ocorrência de geitonogamia com plantas mais altas que produzem mais flores e formam menor número de frutos. As plantas brevistiladas não apresentaram diferenças significativas no número de inflorescências formadas e na eficácia reprodutiva em GF1 e GF2, mantendo assim a mesma probabilidade de ocorrência de cruzamentos geitonogâmicos. Vale ressaltar que o estigma de brevistiladas é em média 2,7 vezes maior que o de longistiladas, o que dificulta a congestão com pólen incompatível, além da forte inibição estigmática ao desenvolvimento destes tubos polínicos.

5.3.2 - Avaliação do esforço reprodutivo

A diferenciação frequente em plantas distílicas, de funções predominantemente femininas (receptoras de pólen) em longistiladas e masculinas (doadoras de pólen) em brevistiladas, não ocorreu em *P. rigida* porque houve aparente inversão de papéis nas duas florações, no que diz respeito à formação de frutos. Grant (1975) coloca que variações intraespecíficas na taxa de cruzamento natural ocorrem em função de condições ambientais diversas e num mesmo local com diferenças entre início, pico e final da floração. A maior ou

menor incidência de geitonogamia, como aqui proposto para *P. rigida*, também interfere. Stephenson & Bertin (1983) afirmam que o controle da planta sobre o fluxo de pólen é limitado, já que este varia, por exemplo, com a densidade populacional e a presença de outras espécies floridas. Assim, se houver pressões de seleção para estabelecimento de doadores de pólen, estas resultarão em aumento da produção de grãos e/ou dos atrativos para polinizadores. Diferenças neste sentido não foram detectadas como significativas, entre as morfais de *P. rigida*, reforçando a idéia que a variação na produção de frutos entre períodos e morfais não está relacionada com funções sexuais diferenciadas. Também não foram encontradas evidências de gêneros funcionais diferentes para as morfais de *Palicourea lasiorrachis* na Costa Rica (Feinsinger & Busby 1987). Sobrevila *et al.* (1983) registraram variações interpopulacionais na eficácia reprodutiva das morfais de *P. petiolaris* e *P. fendleri* na Venezuela.

P. officinalis e *P. rigida* ocorrem simpatricamente e estão envolvidas em algum tipo de mimetismo floral já que florescem simultaneamente, oferecem atrativos e recompensas semelhantes e têm polinizadores comuns como *Colibri serrirostris* e *Bombus morio* (Sergio L. O. Macedo com. pessoal). Como *P. officinalis* também apresenta incompatibilidade heteromórfica, a possível competição inter-específica de grãos de pólen deve diminuir a taxa natural de formação de frutos. Feinsinger e Busby (1987) e Feinsinger *et al.* (1988), em estudos com *P. lasiorrachis* e *Cephaelis elata*, espécies também distílicas e simpátricas, sem distinção polínica intra e interespecífica e polinizadas pela mesma espécie de beija-flor, concluíram que a mistura de pólen encontrada nos estigmas reduz o potencial reprodutivo das duas espécies.

Para as plantas longistiladas da área A, quando comparadas às brevistiladas, registrou-se em geral uma maior variabilidade na produção de grãos de pólen e nos resultados de testes de polinização. Na planta X, em especial, verificou-se alterações na produção de frutos não observadas em plantas brevistiladas. Seus frutos podem ser provenientes de polinizações legítimas e de pseudogamia, o que explicaria os dois frutos formados em teste de autopolinização artificial. Os vizinhos mais próximos da planta X são longistilados, o que pode ter limitado o recebimento de pólen legítimo. Por outro lado, pode tratar-se de uma planta com alterações genéticas que tenham lhe favorecido uma parcial auto-compatibilidade. O índice de heterostilia morfológica da planta X é 0,19, bem abaixo da média (0,30) e do valor encontrado para a planta Y, indicando uma tendência à

homostilia, fenótipo geralmente associado com auto-compatibilidade e com a longistilia (Barrett & Shore 1987, Bir Bahadur 1968). Todavia, Sobrevila *et al.* (1983) registraram para *P. petiolaris*, que apresenta duas morfais distintas, diversos níveis de auto-compatibilidade em diferentes populações com predomínio de plantas longistiladas. Uma destas populações é composta somente por indivíduos longistilados com elevado grau de auto-compatibilidade, justificada pela possível ocorrência de uma recombinação genética que ocasionou o surgimento de grãos de pólen semelhantes aos produzidos por brevistiladas.

5.3.2.1 - Frutos, sementes e dispersão.

A formação de pequenas “estruturas” com polpa semelhante a de frutos maduros mas sem sementes ocorreu na PF e GF2 em três plantas longistiladas. Partenocarpia é a formação de frutos sem que tenha havido fecundação, ou seja o desenvolvimento do ovário contendo em seu interior óvulos que não se desenvolveram em sementes, sendo induzida em plantas cultivadas por meio da aplicação de auxinas e giberelinas (Raven *et al.* 1992). A comparação entre o intervalo de tempo registrado entre o encerramento da floração das plantas em questão, o desenvolvimento dos hipântios (mais de 60 dias) e o intervalo entre polinizações e o surgimento de frutos (ca 10 dias) leva à inferência de que sejam frutos partenocárpicos, pois a ausência de sementes não parece decorrer de abortos pós-polinização.

A taxa média de formação de frutos das morfais de *P. rigida*, 26% para brevistiladas e 27% para longistiladas, se assemelha aos valores encontrados para *Psychotria barbiflora* (Monteiro *et al.* 1991) e *Erythroxylum suberosum* (Barros 1989). Já para *Erythroxylum tortuosum*, espécie também distílica e de cerrado, Barros (*l.c.*) encontrou eficácia reprodutiva superior a 60%. O insucesso dos testes de germinação impede que se avalie os estágios subsequentes do processo reprodutivo.

A taxa de sementes possivelmente viáveis de *P. rigida* assemelha-se às encontradas por Oliveira & Silva (1993) para *Kielmeyera coriacea* e *K. speciosa*. No entanto, o sucesso de germinação de *K. coriacea* (40%) foi bem maior que o de *K. speciosa* (9%). Sabe-se que algumas espécies de cerrado como *Piptocarpha rotundifolia* têm baixas taxas de germinação por não possuírem embrião na maioria de suas sementes e outras

podem entrar em dormência ou possuem embriões indiferenciados quando são dispersas como *Annona crassiflora* (Felippe e Silva, 1984). Tânia Sanaiotti (com. pessoal) realizou testes de germinação com sementes de *P. rigida* provenientes de Alter do Chão (PA), e também não obteve sucesso. A verificação de que os embriões permaneciam viáveis leva à suposição de alguma forma de dormência inata (Fenner 1985). Como não foram encontradas plântulas de *P. rigida* nas áreas observadas fica difícil sugerir o grau de importância de fatores ambientais.

A maioria dos frutos maduros de *P. rigida* desidrataram e permaneceram ligados ao eixo da inflorescência. Este fato foi registrado em todas as áreas de observação. Paes (1993), estudando frugivoria de aves em uma área da FAL, não observou coleta de frutos de *P. rigida*, apesar de constituírem, juntamente com *Chomelia ribesioide* (Rubiaceae), a única oferta de frutos na área durante o final da estação chuvosa de 1992. Alves (1991), em pesquisa também desenvolvida na FAL em 1984, 1985 e 1986, inclui os frutos de *P. rigida* na dieta alimentar de *Neothraupis fasciata*, pássaro generalista que retira a polpa e descarta as sementes, deixando-as muito próximas ao local de coleta dos frutos. Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger (1983), em levantamento feito em Botucatu (SP), citam *P. rigida* como espécie endozoocórica, tendo pássaros como agentes dispersores. T. Sanaiotti (com. pessoal), em três anos de estudos, analisou fezes de pássaros em uma área de savana isolada de Alter do Chão (PA), não encontrando sementes de *P. rigida*, espécie frequente no local.

A mútua dependência entre plantas e dispersores de sementes tem resultado na coevolução de frutos e frugívoros. McKey (1975 *apud* Fenner 1985) postula que frutos comidos por pássaros frugívoros especialistas têm polpa firme, são ricos em gorduras e proteínas e possuem sementes grandes enquanto que, os frutos comidos por generalistas têm tecidos ricos em carboidratos e sementes pequenas. Isto representa um investimento menor para a planta já que muitos desses pássaros não especializados danificam as sementes. Por todas as observações acima relatadas *P. rigida* pertence ao grupo das plantas dependentes de dispersores generalistas, o que permite relacionar a pequena proporção de frutos colhidos com a inconstância desses animais. Os frutos também podem estar sendo utilizados como complementação alimentar de pássaros insetívoros ou nectarívoros, fazendo parte de um forrageamento eventual.

6. CONCLUSÕES

Palicourea rigida apresenta floração do tipo “extensiva”. O principal período reprodutivo ocorre durante a estação chuvosa, com grande número de plantas envolvidas. Na estação seca a floração é esparsa, decorrendo de uma provável estratégia da espécie para manutenção de polinizadores e dispersores durante a maior parte do ano.

Palicourea rigida possui incompatibilidade heteromórfica, o que impede a autofecundação e a fecundação com pólen proveniente de plantas da mesma morfa floral. Em flores longistiladas o sítio de rejeição ao pólen incompatível é a porção basal do estilete. Em flores brevistiladas a reação de incompatibilidade é acentuada, ocorrendo na região estigmática. Possivelmente trata-se de uma adaptação para aumentar a eficácia reprodutiva de plantas brevistiladas que, por possuírem flores com estiletos menores que os estames, entram em contato com seu próprio pólen.

Entre as morfais de *P. rigida*, não há distinção de gêneros funcionais (papéis sexuais). As duas morfais atraem indistintamente os polinizadores, não apresentando diferenças significantes na apresentação de atrativos (cor, forma, tamanho das flores) e produção de recompensas (pólen e néctar).

O principal polinizador de *P. rigida* na área de estudo foi o beija-flor *Colibri serrirostris*. Abelhas como *Apis mellifera*, *Bombus morio* (machos), *Epicharis* sp, *Eulaema nigrita* e *Megachile rubricata* podem realizar eventuais polinizações. Lepidópteros (Hesperídeos e Esfingídeos) também são polinizadores adicionais, especialmente *Aellopus fadus*.

Para plantas longistiladas, geitonogamia parece ser o fator limitante da eficácia reprodutiva. Quanto menor o número de inflorescências desenvolvidas, maior é a eficiência na formação de frutos. Não foram encontrados fatores correlacionados com o sucesso reprodutivo de plantas brevistiladas.

A ocorrência simpátrica e sincronia de floração de *P. rigida*, *P. officinalis* e *P. coriacea* gera uma competição pelo mesmo espectro de polinizadores, reduzindo a eficácia reprodutiva, pelo menos para as duas primeiras, envolvidas em mimetismo floral.

O predomínio de morfas longistiladas na população reprodutiva estudada pode estar relacionado com propagação vegetativa a partir de gemas reparativas das raízes e/ou perda parcial da auto-incompatibilidade.

P. rigida é uma espécie cujos investimentos em floração denotam sua adaptação para xenogamia. A duração da floração, o aparato visual e as recompensas para atrair e direcionar o comportamento dos visitantes florais, evidenciam estratégias para assegurar o sucesso reprodutivo da espécie. Entretanto, pequena quantidade dos frutos que amadurecem são utilizados como alimento, provavelmente por pássaros generalistas. Relativamente ao investimento reprodutivo inicial verifica-se que a dispersão de sementes é pouco eficiente, o que pode estar associado a fatores como competição inter-específica e falta de dispersores especializados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M.A.S. 1991. Dietas e táticas de forrageamento de *Neothraupis fasciata* em cerrado no Distrito Federal, Brasil (Passeriformes: Emberizidae). *Ararajuba* 2: 25-29.
- ANDERSON, W.R. 1973. A morphological hypothesis for the origin of heterostyly in the Rubiaceae. *Taxon* 22(5/6): 537-542.
- BAKER, H.G. 1966. The evolution, functioning and breakdown of heteromorphic incompatibility systems. *Evolution* 20(3): 349-368.
- BAKER, H.G. 1983. An outline of the History of Anthecology, or Pollination Biology. In *Pollination Biology* (L. Real, ed.). Academic Press, USA, p. 7-28.
- BAKER, H.G. & BAKER, I. 1979. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. *Amer. J. Bot.* 66(5): 591-600.
- BAKER, H.G. & BAKER, I. 1983. A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In *The biology of nectaries* (B. Bentley & T.S. Elias, eds.). Columbia University Press, New York, p. 126-152.
- BALBACH, A. 1981. A flora nacional na medicina doméstica. Ed. A Edificação do Lar. v.2. 9.ed. São Paulo.
- BARBOSA, A.A.A. 1983. Aspectos da ecologia reprodutiva de *Qualea* (Vochysiaceae) num cerrado de Brasília, D.F. Dissertação de Mestrado, Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília.
- BARRETT, S.C.H. 1977. Tristyly in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (water hyacinth). *Biotropica* 9(4): 230 -238.
- BARRETT, S.C.H. 1989. The evolutionary breakdown of heterostyly. In *The evolutionary ecology of plants* (J.H. Bock & Y.B. Linhart, eds.). Westview Press, Boulder, p.151-169.
- BARRETT, S.C.H. (Ed.) 1992. *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, Berlin.
- BARRETT, S.C.H. & RICHARDS, J.H. 1990. Heterostyly in tropical plants. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 35-61.
- BARRETT, S.C.H. & SHORE, J.S. 1987. Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* L. complex (Turneraceae). *Evolution* 41(2): 340-354.
- BARRETT, S.C.H. & WOLFE, L.M. 1985. Pollen heteromorphism as a tool in studies of the pollination process in *Pontederia cordata* L. In *Biotechnology and Ecology of Pollen* (D.L. Mulcahy & E. Ottaviano., eds). Springer Berlin Heidelberg, New York, p. 435-442.
- BARROS, M.A.G. 1982. Plantas medicinais - Usos e tradições em Brasília - DF. VII Simpósio de Plantas Medicinais. *Oréades* 8(14/15): 140-151.
- BARROS, M.A.G. 1989. Studies on the pollination biology and breeding systems of some genera with sympatric species in the Brazilian Cerrados. PhD thesis, University of St. Andrews, Scotland. UK.
- BARROS, M.A.G. 1990. Estratégias de polinização de 4 espécies de *Kielmeyera* ocorrentes em cerrados da Fazenda Água Limpa, D.F. In *Resumos do XLI Congresso Nacional de Botânica*. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, p. 421.
- BARROS, M.A.G. 1992. Fenologia da floração, estratégias reprodutivas e polinização de espécies simpátricas do gênero *Byrsonima* Rich (Malpighiaceae). *Rev. Brasil. Biol.* 52(2): 343-353.
- BAUMGARTEN, J.E. 1994. Oferta de néctar e produção de frutos em uma população de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) num cerrado do D.F. Dissertação de Mestrado, Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília.

- BAWA, K.S. 1983. Patterns of flowering in tropical plants. In Handbook of experimental pollination Biology (C.E. Jones & R.J. Little, eds.). Scientific and Academic Editions, New York, p. 394-410.
- BAWA, K.S. & BEACH, J.H. 1983. Self-incompatibility systems in the Rubiaceae of a tropical lowland wet forest. Amer. J. Bot. 70(9): 1281-1288.
- BEACH, J.H. & BAWA, K.S. 1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distyly. Evolution 34(6): 1138-1142.
- BIR BAHADUR 1968. Heterostyly in Rubiaceae. A review. J. Osmania Univ. Sci. Golden Jubilee Vol.: 207-238.
- BRIGGS, D. & WALTERS, S.M. 1990. Plant variation and evolution. 2nd ed. Cambridge University Press. Cambridge.
- CASPER, B.B. 1985. Self-compatibility in distylous *Cryptantha flava* (Boraginaceae). New Phytol. 99: 149-154.
- CASPER, B.B. 1992. The application of sex allocation theory to heterostylous plants. In Evolution and function of heterostyly (S.C.H. Barrett, ed). Springer-Verlag, Berlin, p. 209-224.
- CASPER, B.B. & CHARNOV, E.L. 1982. Sex allocation in heterostylous plants. Journal of Theor. Biology 96: 143-149.
- CASPER, B.B., SAYIGH, L.S. & LEE, S.S. 1988. Demonstration of cryptic incompatibility in distylous *Amsinckia douglasiana*. Evolution 42(2): 248-253.
- CHARLESWORTH, B. & CHARLESWORTH, D. 1979. The maintenance and breakdown of distyly. Am. Nat. 114(4): 499-513.
- CHARLESWORTH, D. & CHARLESWORTH, B. 1979. A model for the evolution of distyly. Am. Nat. 114(4): 467-498.
- CHARLESWORTH, D. & MORGAN, M.T. 1991. Allocation of resources to sex functions in flowering plants. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 332: 91-102.
- CONCEIÇÃO, M. 1980. As plantas medicinais no ano 2000. Tao Livraria e Ed. Ltda. Brasília.
- CRUDEN, R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. Evolution 31: 32-46.
- CRUDEN, R.W. & HERMANN, S.M. 1983. Studying nectar? Some observations on the art. In The Biology of Nectaries (B. Bentley & T.S. Elias, eds.), Columbia University Press, New York, p. 223-241.
- DAFNI, A. 1992. Pollination Ecology - A practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- DARWIN, C. 1877. The different forms of flowers on plants of the same species. In The works of Charles Darwin, 1972, Vol 14, AMS Press. New York.
- DULBERGER, R. 1973. Distyly in *Linum pubescens* and *L. mucronatum*. Bot. J. Linn. Soc. 66: 117-126.
- DULBERGER, R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In Evolution and function of heterostyly (S.C.H. Barrett, ed). Springer-Verlag, Berlin, p. 41-84.
- EITEN, G. 1963. Taxonomy and regional variation of *Oxalis* section Corniculatae. I. Introduction, keys and synopsis of species. The American Midland Naturalist 69(2): 257-309.
- ELLEMAN, C.J. & DICKINSON, H.G. 1990. The role of the exine coating in pollen-stigma interactions in *Brassica oleracea* L. New Phytol. 114(3): 511-518.
- FAEGRI, K. & VAN DER PIJL, L. 1971. The principles of pollination ecology. Pergamon Press. Oxford.

- FEINSINGER, P. 1983. Variable nectar secretion in a *Heliconia* species pollinated by hermit hummingbirds. *Biotropica* 15(1): 48-52.
- FEINSINGER, P. & BUSBY, W.H. 1987. Pollen carryover: experimental comparisons between morphs of *Palicourea lasiorrachis* (Rubiaceae) a distylous, bird-pollinated, tropical treelet. *Oecologia* (Berlin) 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.
- FELIPPE, G.M. e SILVA, J.C.S. 1984. Estudos de germinação em espécies de cerrado. *Revta brasil. Bot.* 7(2): 157-163.
- FENNER, M. 1985. Seed ecology. Chapman and Hall. London.
- FRANKLIN-TONG, V.E., LAWRENCE, M.J. & FRANKLIN, F.C.H. 1988. An "in vitro" bioassay for the stigmatic product of the self-incompatibility gene in *Papaver rhoeas* L. *New Phytol.* 110(1): 109-118.
- GANDERS, F.R. 1979a. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607-635.
- GANDERS, F.R. 1979b. Heterostyly in *Erythroxylum coca* (Erythroxylaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 78: 11-20.
- GANDERS, F.R., DENNY, S.K. & TSAI, D. 1985. Breeding systems and genetic variation in *Amsinckia spectabilis* (Boraginaceae). *Can. J. Bot.* 63: 533-538.
- GENTRY, A.H. 1974. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica* 6(1): 64-68.
- GIBBS, P.E. 1986. Do homomorphic and heteromorphic self-incompatibility systems have the same sporophytic mechanism? *Pl. Syst. Evol.* 154: 285-323.
- GIBBS, P.E. 1990. Self-incompatibility in flowering plants: a neotropical perspective. *Revta. brasil. Bot.* 13: 125-136.
- GIBBS, P.E. & TARODA, N. 1983. Heterostyly in the *Cordia alliodora* - *C. trichotoma* complex in Brazil. *Revta. brasil. Bot.* 6: 1-10.
- GOTTSBERGER, G. 1986. Some pollination strategies in neotropical savannas and forests. *Pl. Syst. Evol.* 152: 29-45.
- GOTTSBERGER, G. & SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. 1983. Dispersal and distribution in the Cerrado vegetation of Brazil. *Sonderbd. naturwiss. Ver. Hamburg* 7: 315-352.
- GRANDI, T.S.M., TRINDADE, J.A., PINTO, M.J.F., FERREIRA, L.L. & CATELLA, A.C. 1989. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. *Acta bot. bras.* 3(2), supl.
- GRANT, V. 1975. Genetics of flowering plants. Columbia University Press. New York.
- GRANT, V. 1981. Plant Speciation. 2nd ed. Columbia University Press. New York.
- GRIBEL, R. & HAY, J.D. 1993. Pollination ecology of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) in Central Brazil cerrado vegetation. *J. Trop. Ecol.* 9: 199-211.
- 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.
- HENRIQUES, R.P.B. 1993. Organização e estrutura das comunidades vegetais de cerrado em um gradiente topográfico no Brasil Central. Tese de Doutorado em Biologia (Ecologia), Universidade de Campinas, Campinas, SP.
- HESLOP-HARRISON, Y. & SHIVANNA, K.R. 1977. The receptive surface of the angiosperm stigma. *Ann. Bot.* 41: 1233-1258.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill. New York.

- JONG, T.J. de, WASER, N.M., PRICE, M.V. & RING, R.M. 1992. Plant size, geitonogamy and seed set in *Ipomopsis aggregata*. *Oecologia* 89: 310-315.
- KEARNS, C.A. & INOUE, D.W. 1993. Techniques for pollination biologists. University Press of Colorado. Niwot.
- KLEIN, R.M. & KLEIN, D.T. 1970. Research methods in plant science. The Natural History Press. New York.
- LEWIS, D. 1979. Sexual incompatibility in plants. Edward Arnold. London.
- LEWIS, D. & JONES, D.A. 1992. The genetics of heterostyly. In Evolution and function of heterostyly (S.C.H. Barrett, ed). Springer-Verlag, Berlin, p. 129-150.
- LIMA, H.A. de. 1986. Contribuição ao estudo da Biologia Floral, da Fenologia e do Sistema de Reprodução de *Psychotria leiocarpa* Cham. et Schl. (Rubiaceae). Dissertação de Mestrado em Botânica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- LLOYD, D.G. & WEBB, C.J. 1992. The evolution of heterostyly. In Evolution and function of heterostyly (S.C.H. Barrett, ed). Springer-Verlag, Berlin, p. 151-178.
- MARTIN, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technol.* 34: 125-128.
- MATTSSON, O., KNOX, R.B., HESLOP-HARRISON, J. & HESLOP-HARRISON, Y. 1974. Protein pellicle of stigmatic papillae as a probable recognition site in incompatibility reactions. *Nature* 247: 298-300.
- MCKENNA, M.A. 1985. Heterostyly and microgametophytic selection: the effect of pollen competition on sporophytic vigor in two distylous species. In Biology and Ecology of pollen (Mulcahy *et al.*, ed). Elsevier, New York, p. 443-448.
- MCKENNA, M.A. 1992. Pollen competition in heterostylous plants. In Evolution and function of heterostyly (S.C.H. Barrett, ed). Springer-Verlag, Berlin, p. 225-246.
- MONTEIRO, R., NAKAJIMA, J.N., RIBEIRO, J.E.L. da S. & TOLEDO, J.C. 1991. Morfologia e distribuição espacial das formas heterostílicas de *Psychotria barbiflora* D.C.(Rubiaceae). *Naturalia(SP)* 16: 137-146.
- MURRAY, B.G. 1986. Floral biology and self-incompatibility in *Linum*. *Bot. Gaz.* 147(3): 327-333.
- NORONHA, M.R.P. & GOTTSBERGER, G. 1980. A polinização de *Aspilia floribunda* (Asteraceae) e *Cochlospermum regium* (Cochlospermaceae) e a relação das abelhas visitantes com outras plantas do cerrado de Botucatu, SP. *Revta. brasil. Bot.* 3: 67-77.
- O'NEIL, P. 1992. Variation in male and female reproductive success among floral morphs in the tristylous plant *Lythrum salicaria* (Lythraceae). *Amer. J. Bot.* 79(9): 1024-1030.
- OLESEN, J.M. 1979. Floral morphology and pollen flow in the heterostylous species *Pulmonaria obscura* Dumort (Boraginaceae). *New Phytol.* 82: 757-767.
- OLIVEIRA, P.E.A.M. 1991. The pollination and reproductive biology of a cerrado woody community in Brazil. PhD thesis, University of St. Andrews, Scotland.
- OLIVEIRA, P.E. & SILVA, J.C.S. 1993. Reproductive biology of two species of *Kielmeyera* (Guttiferae) in the cerrados of Central Brazil. *J. Trop. Ecol.* 9: 67-79.
- OLIVEIRA, P.E., GIBBS, P.E., BARBOSA, A.A. & TALAVERA, S. 1992. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. *Pl. Syst. Evol.* 179: 207-219.
- OPLER, P.A.; BAKER, H.G. & FRANKIE, G.W. 1975. Reproductive biology of some Costa Rica *Cordia* species (Boraginaceae). *Biotropica* 7(4): 234-247.
- ORMOND, T.W., LIMA, M.A., PINHEIRO, M.C.B. & PIMENTA, M.L. 1986. Contribuição ao estudo da reprodução de *Psychotria leiocarpa* Cham & Schl. e *P.nuda* (C.& A.) Wanse. In Resumos do XXXVII Congr. Nac. Botânica, Ouro Preto, p. 41.

- ORNDUFF, R. 1966. The origin of dioecism from heterostyly in *Nymphoides* (Menyanthaceae). *Evolution* 20(3): 309-314.
- ORNDUFF, R. 1970. Incompatibility and the pollen economy of *Jepsonia parryi*. *Amer. J. Bot.* 57(9): 1036-1041.
- ORNDUFF, R. 1979. Pollen flow in a population of *Primula vulgaris* Huds. *Bot. J. Linn. Soc.* 78: 1-10.
- ORNDUFF, R. 1986. Comparative fecundity and population composition of heterostylous and non-heterostylous species of *Villarsia* (Menyanthaceae) in western Australia. *Amer. J. Bot.* 73(2): 282-286.
- ORNDUFF, R. 1992. Historical perspective on heterostyly. In *Evolution and function of heterostyly* (S.C.H. Barrett, ed). Springer-Verlag, Berlin, p. 31-39.
- PACHECO, R.P. de B. & COLEMAN, J.R. 1989. Reproductive morphology, genetic control and incompatibility relations in tristylous *Oxalis physocalyx* (Oxalidaceae). *Revta brasil. Genet.* 12(2): 347-359.
- PAES, M.M.N. 1993. Utilização de frutos por aves em uma área de cerrado do Distrito Federal. Dissertação de Mestrado em Ecologia da Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- PIO CORRÊA, M. 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, RJ, v. 2.
- PROENÇA, C.E.B. & GIBBS, P.E. 1994. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. *New Phytol.* 126: 343-354.
- PYKE, G.H. & WASER, N.M. 1981. The production of dilute nectars by hummingbird and honeyeater flowers. *Biotropica* 13(4): 260-270.
- RAJU, M.V.S., COUPLAND, R.T. & STEEVES, T.A. 1966. On the occurrence of root buds on perennial plants in Saskatchewan. *Can. J. Bot.* 60: 2119-2125.
- RATTER, J.A. 1986. Notas sobre a vegetação da Fazenda Água Limpa (Brasília - DF). Ed. Universidade de Brasília. Brasília.
- RAVEN P.H., EVERT, R.F. & EICHORN, S.E. 1992. *Biology of plants*. Worth Publishers. New York.
- RAWITSCHER F. & RACHID, M. 1946. Troncos subterrâneos de plantas brasileiras. *An. Acad. brasil. Ciênc.* 18(4): 261-280.
- RICHARDS, A.J. 1986. *Plant breeding systems*. George Allen & Unwin. London.
- RICHARDS, J.H. & BARRETT, S.C.H. 1992. The development of heterostyly. In *Evolution and function of heterostyly* (S.C.H. BARRETT, ed). Springer-Verlag, Berlin, p. 85-127.
- RICO-GRAY, V. 1989. The importance of floral and circum-floral nectar to ants inhabiting dry tropical lowlands. *Biological Journal of the Linnean Society* 38: 173-181.
- ROBBRECHT, E. 1988. *Tropical woody Rubiaceae*. Meise Nationale Plantetuin van Belgie. Bélgica.
- SALGADO-LABORIAU, M.L. 1971. Contribuição à palinologia dos cerrados. FNDCT/ Acad. Brasil. Ciências. Rio de Janeiro.
- SCARIOT, A.O. 1987. Biologia reprodutiva de *Acrocomia aculeata* (Jacquin) Loddiges ex Martius (Palmae) no Distrito Federal. Dissertação de Mestrado, Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília. Brasília, DF.
- SCHOU, O. & PHILIPP, M. 1983. An unusual heteromorphic incompatibility system. II. Pollen tube growth and seed sets following compatible and incompatible crossings within *Anchusa officinalis* L. (Boraginaceae). In *Pollen: Biology and implications for plant breeding* (D.L.Mulcahy and E.Ottaviano, eds.). Elsevier Science. New York. p. 219-227.

- SICK, H. 1986. Ornitologia Brasileira. Ed. Universidade de Brasília, Brasília, DF, v. 1.
- SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. & GOTTSBERGER, G. 1988. A polinização de plantas do Cerrado. Rev. Brasil. Biol. 48(4): 210-226.
- SILVA, A.P., CALDAS, L.S. & BARROS, M.A.G. 1995. Heteromorfismo floral e crescimento de tubos polínicos em *Palicourea rigida* H.B.K. (Rubiaceae). In Resumos do XLVI Congresso Nacional de Botânica, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, p. 144.
- SMITH, G.F. & TIEDT, L.R. 1991. A rapid, non-destructive osmium tetroxide technique for preparing pollen for scanning electron microscopy. Taxon 40: 195-200.
- SOBREVILA, C., RAMIREZ, N. & ENRECH, N.X. 1983. Reproductive biology of *Palicourea fendleri* and *P. petiolaris* (Rubiaceae), heterostylous shrubs of a tropical cloud forest in Venezuela. Biotropica 15(3): 161-169.
- STANLEY, R.G. & LINSKENS, H.F. 1974. Pollen: Biology, Biochemistry, Management. Springer-Verlag, Berlin.
- STEPHENSON, A.G. & BERTIN, R.I. 1983. Male competition, female choice, and sexual selection in plants. In Pollination Biology (L. Real, ed.). Academic Press, USA, p. 110-151.
- STEYERMARK, J.A. 1974. Rubiaceae - Flora de Venezuela. Vol IX, 3^a parte. Edición Especial del Instituto Botánico. Venezuela.
- TAYLOR, C.M. 1989. Revision of *Palicourea* (Rubiaceae) in Mexico and Central America. In Systematics Botany Monographs 26: 1-102.
- VUILLEUMIER, B.S. 1967. The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. Evolution 21: 210-226.
- WASER, N.M. 1983. Adaptive nature of floral traits. In Pollination Biology (L. Real, ed.). Academic Press, USA, p. 241-285.
- WEBERLING, F. 1992. Morphology of flowers and inflorescences. Cambridge University Press, Cambridge.
- WEIMER, B.R., CORE, E.L. & CLARKSON, R.B. 1962. A new manual for the biology laboratory. John Wiley & Sons. New York.
- WELLER, S.G. 1992. Evolutionary modifications of tristylous breeding systems. In Evolution and function of heterostyly (S.C.H. Barrett, ed). Springer-Verlag, Berlin, p. 31-39.
- YEO, P.F. 1975. Some aspects of heterostyly. New Phytol. 75(1): 147-153.
- ZEISLER, M. 1938. Über die Abgrenzung der eigentlichen Narbenfläche mit Hilfe von Reaktionen. Beih. bot. Zbl. A 58: 308-318.