



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

BIOLOGIA DA POLINIZAÇÃO DE *Palicourea* AUBL. E *Psychotria* L. (RUBIACEAE): VARIAÇÕES E FUNCIONALIDADE DA HERCOGAMIA RECÍPROCA E DOS POLINIZADORES.

MARCO TÚLIO RODRIGUES FURTADO

ORIENTADOR: HÉLDER NAGAI CONSOLARO

BRASÍLIA – DF
SETEMBRO DE 2019



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

BIOLOGIA DA POLINIZAÇÃO DE *Palicourea* AUBL. E *Psychotria* L. (RUBIACEAE): VARIAÇÕES E FUNCIONALIDADE DA HERCOGAMIA RECÍPROCA E DOS POLINIZADORES.

MARCO TÚLIO RODRIGUES FURTADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Botânica.

ORIENTADOR: HÉLDER NAGAI CONSOLARO

BRASÍLIA – DF
SETEMBRO DE 2019

MARCO TÚLIO RODRIGUES FURTADO**BIOLOGIA DA POLINIZAÇÃO DE *Palicourea* AUBL. E *Psychotria* L. (RUBIACEAE): VARIAÇÕES E FUNCIONALIDADE DA HERCOGAMIA RECÍPROCA E DOS POLINIZADORES.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Botânica.

Aprovada em 27 de setembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Carolyn Elinore Barnes
Universidade de Brasília - UnB
Membro titular

Prof. Dra. Aline Cristina Martins
Universidade de Brasília - UnB
Membro titular

Prof. Dra. Victoria Ferrero
Universidade de Coimbra - Portugal
Membro titular

Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro
Universidade Federal de Goiás - UFG
Orientador

Prof. Dr. Pedro Henrique Brum Togni
Universidade de Brasília - UnB
Membro Suplente

BRASÍLIA – DF
SETEMBRO DE 2019

“Não creio que nada em minha vida científica tenha me dado tanta satisfação como descobrir o significado das estruturas dessas plantas”

The autobiography of Charles Darwin: 1809-1882
(Collins, London)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família (Pai, Mãe e Irmã), sem vocês essa conquista não seria possível, obrigado por todo apoio, carinho, amor, e paciência durante esse longo caminho percorrido. Saibam que vocês são as colunas de toda essa obra. Amo muito vocês, Cleber, Rosilene, e Thayane Furtado. Obrigado minha FAMÍLIA.

Meus sinceros agradecimentos ao meu Professor e orientador Dr. Hélder Nagai Consolaro. A caminha nossa foi longa em!!! Agradeço muito por você ter aceitado eu como seu aluno lá em 2009, bem pirralhinho. Rsr. Foi apenas para um trabalho de iniciação né, mais que prolongou-se pelo mestrado e doutorado. Esse tempo todo juntos me proporcionou um enorme crescimento, tanto no aspecto profissional (pesquisador e professor), como no aspecto humano, seus ensinamentos formam fundamentais para minha formação. Por fim, meu muito obrigado pela sua amizade e por sempre ter depositado toda a sua confiança em mim para realização de todos meus momentos acadêmicos.

Meus agradecimentos em especial ao laboratório de Biologia Reprodutiva da Universidade Federal de Goiás (Catalão), por disponibilizar equipamentos e todo conhecimento possível para o desenvolvimento do estudo. Sem o apoio de vocês esse estudo não seria possível de acontecer. Muito obrigado!!!

Aos meus companheiros e grandes amigos do laboratório de Biologia Reprodutiva da Universidade Federal de Goiás (Catalão). Obrigado por todos os momentos de aprendizados que passamos juntos ao longo todos desses anos. A amizade e o companheirismo de vocês foi essencial nesse processo. Túlio de Sá, Ebenézer Rodrigues, Raphael Matias, Jessyca Santana, Vanessa Marcelo, Paola Pissetta. Valeu gente!!!

Gostaria de agradecer ao Programa de Pós-graduação em Botânica, da Universidade de Brasília, pela a oportunidade do estudo. Obrigado também a todos os professores, funcionários e amigos que sempre contribuíram na realização do estudo durante esses quatro anos.

A minha companheira Leticia Gomes, obrigado por compartilhar desse sonho junto comigo, minha conquista é sua também. Sou muito grato pelo seu apoio. O seu companheirismo, amor e compreensão foram essenciais ao longo desses quatro anos. Obrigado também por todas as suas contribuições e sugestões ao longo da tese.

A todo o pessoal da república da “Tapera do Lago”, que sempre me acolheu em Brasília, obrigado por todos os momentos juntos, em especial ao Gustavo Mariano meu amigo de longa data. Obrigado por tudo.

Aos membros da banca, obrigado por aceitarem participar desse momento da tese. Suas contribuições, ensinamentos e sugestões serão essenciais para a conclusão deste estudo.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Decanato de Pós-Graduação da UnB pelo auxílio para as coletas.

A FAPDF (Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal) pelos auxílios a viagens para congressos e visita técnica.

SUMÁRIO

Folha de rosto	ii
Página de aprovação	iii
Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Sumário	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	x
Resumo	xii
Abstract	xiii
Introdução Geral	1
Capítulo 1: Variações da hercogamia recíproca (inacurácia): Fatores que afetam esse mecanismo em espécies distílicas de Rubiaceae.....	15
Capítulo 2: Do reciprocal herkogamy and pollinators affect the legitimate pollen flow in distylous species?.....	43
Capítulo 3: Capítulo 3. A eficácia dos beija-flores e abelhas no serviço de polinização em <i>Palicourea rigida</i> Kunth (Rubiaceae).....	82
Considerações finais	101

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: Variações da hercogamia recíproca (inacurácia): Fatores que afetam esse mecanismo em espécies distílicas de Rubiaceae.

Figura 1. Esquema representativo da posição relativa dos órgãos sexuais (anteras e estigma) do morfo longistilo e brevistilo em espécies distílicas. Entre parêntese são as iniciais utilizadas para cada tipo de órgão nas análises da reciprocidade. Figura adaptada de Cardoso et al. (2018)..... 23

Figura 2. Resultado da análise de componente principal (PCA) usando os três níveis de hercogamia recíproca mensurados em populações dos gêneros *Palicourea* e *Psychotria*. (A) Reciprocidade total; (B) Reciprocidade dos órgãos altos; (C) Reciprocidade dos órgãos baixos..... 24

Figura 3. Valores da contribuição de cada componente da inacurácia para o valor final da reciprocidade de cada um dos órgãos. (A) Órgãos altos; (B) Órgãos baixos. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas ($p < 0.05$) dentro de cada órgão..... 25

Figura 4. Relação entre o comprimento da corola e a inacurácia da reciprocidade floral das populações de *Palicourea* Aubl. e *Psychotria* L. (A) Reciprocidade total; (B) Reciprocidade dos órgãos altos; (C) Reciprocidade dos órgãos baixos..... 27

Capítulo 2. Do reciprocal herkogamy and pollinators affect the legitimate pollen flow in distylous species?

Figure 1. Frequency distribution of the number of pollen grains of L- and S- morph, according to their diameter class, of five populations of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil. Dotted lines indicate classes with more than 80% of overlapping between morphs that were excluded from the analysis the flow of pollen..... 71

Figure 2. Relationship between the proportion of legitimate pollen deposited on stigmas and floral reciprocity in five population of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil..... 72

Figure 3. Relationship between the proportion of legitimate pollen deposited on stigmas and the length of stigmatic lobe in five population of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil. 73

Figure 4. Proportion of legitimate pollen grains deposited on stigmas of L- and S- morphs of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) according to the number pollinator groups, in Cerrado areas of Central Brazil (mean \pm SD). Pollinator group and plant species are: One = Hummingbirds (*Palicourea rigida*, Area 1); Two = Native bees and hummingbirds (*Palicourea officinalis*); Two(-) = Native bees and Lepdoptera (*Psychotria trichophoroides*); Two(--)= Native and exotic bees

(*Psychotria nitidula*); Three = Native bees and hummingbirds and Lepdoptera (*Palicourea rigida*, Area 2). Asterisk refer to statistical differences between morphs within each pollinator group (***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05). 74

Figure S1. Bees and hummingbirds visiting flowers of four population of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil. **(A)** Hummingbird *Amazilia fimbriata* visiting *Palicourea rigida* (Area 2). **(B)** Hummingbird *Colibri serrirostris* visiting *Palicourea officinalis*. **(C)** Bee *Epicharis flava* visiting *Palicourea rigida* (Area 2). **(D)** Bee *Bombus* sp. visiting *Palicourea officinalis*. **(E)** Bee *Epicharis flava* visiting *Psychotria trichophoroides*. **(F)** Exotic bee *Apis mellifera* visiting *Psychotria nitidula*..... 78

Capítulo 3. A eficácia dos beija-flores e abelhas no serviço de polinização em *Palicourea rigida* Kunth (Rubiaceae).

Figura 1. Polinizadores visitando as flores de *Palicourea rigida* Kunth. (Rubiaceae). **(A)** Beija-flor *Amazilia fimbriata* e flor do morfo longistilo. **(B)** Abelha *Epicharis flava* e flor do morfo brevistilo..... 88

Figura 2. Número de grãos de pólen dos morfos brevistilo e longistilo depositados no bico do beija-flor **(A)** e no corpo da abelha **(B)** em *Palicourea rigida* Kunth. (Rubiaceae). Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas ($p < 0.001$) dentro de um morfo. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as partes correspondentes do corpo ou do bico dos polinizadores entre dois morfos. 90

Figura 3. Número de grãos de pólen legítimo **(A)** e ilegítimo **(B)** depositados sobre a superfície estigmática dos morfo brevistilo e longistilo após uma única visita dos polinizadores abelha em *Palicourea rigida* Kunth. (Rubiaceae). Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas ($p < 0.001$) dentro de um morfo. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre polinizadores similares entre dois morfos. 91

Figura 4. Porcentagem de frutos formados após uma única visita do beija-flor ou da abelha, e após visitas ao longo do dia de beija-flores e da abelhas (controle) em *Palicourea rigida* Kunth. (Rubiaceae). Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas ($p < 0.001$) dentro de um morfo. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre polinizadores similares entre dois morfos. 92

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1: Variações da hercogamia recíproca (inacurácia): Fatores que afetam esse mecanismo em espécies distílicas de Rubiaceae.

Tabela 1. Resultados do modelos lineares mistos (LMMs) realizados para testar o efeito das diferentes variáveis preditoras na hercogamia recíproca total, dos órgãos altos e baixos das populações de *Palicourea* Aulb. e *Psychotria* L. (Em negrito são as variáveis respostas)..... **26**

Tabela S1. Estimativas da inacurácia da reciprocidade das 95 populações de *Palicourea* Aulb. e *Psychotria* L. Os valores da inacurácia dos órgãos são apresentados em mm² e em porcentagem (%) que somam 100% (coluna 2 e 3). A inacurácia total é a somatória dos valores de inacurácia dos dois tipos de órgãos dada em mm² (coluna 4) e em seu valor estandardizado % (coluna 5)..... **38**

Capítulo 2. Do reciprocal herkogamy and pollinators affect the legitimate pollen flow in distylous species?

Table 1. Height of stigmas and anthers (mm), and estimation of reciprocity (inaccuracy) of five population of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil. Values in parenthesis represent the percentage of total inaccuracy. Area 1 (*); Area 2 (**)...... **75**

Table 2. Results of generalized linear mixed-effect models fitted to test the effect of types of morph, floral reciprocity and length of stigmatic lobe on the deposition of legitimate pollen grains on stigmas of five populations of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil..... **76**

Table 3. Groups of pollinators and frequency of visits in five populations of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil. Bold values represent the main group of visitors of each population. Area 1 (*); Area 2 (**)...... **77**

Table S1. Results of Student's t test of pollen grains diameter between morphs of five population of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil. Values: Mean ± Standard Deviation. Area 1 (*); Area 2 (**)...... **79**

Table S2. Number and absolute frequency (%) of visitor species in the of five population of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil. Area 1 (*); Area 2 (**)...... **80**

Capítulo 3. A eficácia dos beija-flores e abelhas no serviço de polinização em *Palicourea rigida* Kunth (Rubiaceae).

Tabela 1. Sequências utilizadas para testar o efeito dos beija-flores e das abelhas no fluxo de pólen legítimo e ilegítimo em *Palicourea rigida* Kunth. (Rubiaceae)..... **86**

Tabela 2. Resultados dos diferentes modelos lineares generalizados realizados para testar distintos efeitos: a deposição de grãos de pólen na parte específicas do corpo dos polinizadores; a deposição de grãos de pólen legítimo e ilegítimo após a visita dos diferentes grupos de polinizadores; a produção de frutos após única visita de abelha e beija-flores em *Palicourea rigida* Kunth. (Rubiaceae)..... **89**

RESUMO

A evolução da distília é relatada como uma estratégia para melhorar a transferência de pólen cruzado e assim reduzir a perda de gametas. Esse sistema possuiu um ajuste morfológico das estruturas florais, de modo que ela apresenta dois morfos em uma mesma população, com uma posição recíproca das anteras e estigmas entre esses morfos. Nesse polimorfismo floral a presença de polinizadores eficazes é primordial, pois esses agentes são considerados os principais responsáveis pela a evolução e funcionalidade da hercogamia recíproca. Varias espécies distílicas, como as dos gêneros *Psychotria* e *Palicourea* mostram que a reciprocidade perfeita é na maioria das vezes ausente, sendo tal fenômeno atribuído a diferentes fatores. O objetivo geral dessa tese foi analisar quais fatores ecológicos/morfológicos estão envolvidos nessas variações da hercogamia recíproca, investigar sua relação com o fluxo de pólen legítimo entre os morfos e testar o papel de diferentes polinizadores no serviço de polinização em populações de *Psychotria* e *Palicourea*. A tese esta organizada em três capítulos com os seguintes objetivos específicos: 1) investigar quais componentes contribuem mais para o cálculo da inacurácia (reciprocidade) e testar quais possíveis fatores explicam as variações da reciprocidade; 2) analisar se a hercogamia recíproca, lobo do estigma e os polinizadores afetam o fluxo de pólen legítimo; 3) comparar a eficácia de dois grupos de polinizadores (beija-flores e abelhas) na deposição, no transporte de pólen e no sucesso reprodutivo. A reciprocidade não foi diferente entre os gêneros, contudo esse fator variou entre os órgãos sexuais de cada morfo, no qual os órgãos baixos (estigma brevistila e antera longistila) foram os mais recíprocos. O viés maladaptativo (desvio do ótimo), foi o principal componente que contribuiu para o cálculo da inacurácia, sobretudo nos órgãos baixos. Além disso, o aumento do coeficiente de variação da corola afetou negativamente a hercogamia recíproca. Essas variações da reciprocidade e o comprimento do lobo do estigma tiveram efeito no fluxo de pólen legítimo, e a presença de mais grupos de polinizadores não assegurou um fluxo de pólen simétrico entre os morfos. Os dois níveis de anteras depositaram os grãos de pólen em partes diferentes no corpo dos dois grupos de polinizadores, contudo os beija-flores foram mais eficazes em transferir pólen para os estigmas do que as abelhas, especialmente no morfo brevistilo. Por outro lado, essa diferença não foi encontrada na produção de frutos, demonstrando que ambos os polinizadores são eficazes no serviço de polinização.

Palavras-chave: polimorfismo floral; heterostilia; distília; reciprocidade; inacurácia; corola; fluxo de pólen; eficácia; polinização; beija-flores; abelhas.

ABSTRACT

The evolution of distyly is reported as a strategy to improve cross-pollen transfer and thus reduce gametes loss. This system has a morphological adjustment of the floral structures, so that it presents two morphs in the same population, with a reciprocal position of anthers and stigmas between these morphs. In this floral polymorphism, the presence of effective pollinators is primordial since these agents are considered the main responsible for the evolution and functionality of reciprocal herkogamy. Several distylous species, such as *Psychotria* and *Palicourea*, show that the perfect reciprocity is mostly absent, being this phenomenon attributed to different factors. The general objective of this thesis was to analyze which ecological/morphological factors are involved in these variations of reciprocal herkogamy, investigate their relationship with the of legitimate pollen flow between the morphs, and test the role of different pollinators in the pollination service in populations of *Psychotria* and *Palicourea*. The thesis is organized into three chapters with the following specific objectives: 1) to investigate which components contribute most to the calculation of inaccuracy (reciprocity) and to test which possible factors explain the variations in reciprocity; 2) to analyze whether reciprocal herkogamy, stigmatic lobe, and pollinators affect the flow of legitimate pollen; 3) to compare the effectiveness of two groups of pollinators (hummingbirds and bees) in deposition, pollen transport, and reproductive success. Reciprocity was not different between genders, but this factor varied between the sexual organs of each morph, in which the lower organs (S-stigmas and L-anthers) were the most reciprocal. The maladaptive bias (deviation from the optimal) was the main component that contributed to the calculation of inaccuracy, especially in the lower organs. Also, the rise in the corolla coefficient of variation negatively affected reciprocal herkogamy. These variations in reciprocity and the length of the stigmatic lobe affected the legitimate pollen flow, and the presence of more pollinator groups did not ensure a symmetrical flow of pollen between the morphs. The two levels of anthers deposited pollen grains in different parts in the body of the two groups of pollinators, however hummingbirds were more effective in transferring pollen to the stigmata than bees, especially in the S-morph. On the other hand, this difference was not found in fruit production, demonstrating that both pollinators are effective in pollination service.

Key words: floral polymorphism; heterostyly; distyly; reciprocity; inaccuracy; corolla; pollen flow; effectiveness; pollination; hummingbirds; bees.

INTRODUÇÃO GERAL

A maioria das angiospermas apresenta flores, predominantemente, hermafroditas (Bawa et al. 1985, Barrett 2002), sendo o estado deste caráter considerado ancestral no grupo (Sauquet et al. 2017). Considera-se que esse tipo de sistema sexual facilita a polinização, pois permite, simultaneamente, a remoção e deposição de grãos de pólen por meio das visitas dos polinizadores (Massinga et al. 2005, Barrett & Shore 2008). Contudo, a presença desse tipo de flor pode reduzir o fitness reprodutivo e diminuir as oportunidades de cruzamentos entre indivíduos, aumentando a autofertilização e a interferência sexual entre as funções masculinas e femininas (Barrett 2002). O maior problema da interferência sexual é que ela pode causar endogamia (reprodução entre indivíduos geneticamente próximos). Nesse sentido, as angiospermas evoluíram em busca de estratégias morfológicas e fisiológicas que potencializem a reprodução cruzada (xenogamia) e evitem danos causados pela interferência sexual (autogamia) (Barrett 2002). Dentre essas estratégias, vale destacar a hercogamia, dicogamia, heterostilia, enantiostilia, flexistilia, dimorfismo estilar e os sistemas de incompatibilidade (Cardoso et al. 2018). De todas as estratégias relatadas, a heterostilia é um sistema peculiar porque apresenta um ajuste morfológico das estruturas florais para potencializar o fluxo polínico cruzado e reduzir a perda de gametas, além de uma barreira fisiológica que evita à autogamia.

A heterostilia é um polimorfismo sexual, no qual apresenta populações com dois (distília) ou três (tristília) morfos florais que se diferem quanto à posição dos estigmas e anteras (Webb & Lloyd 1986, Barrett & Shore 2008). A maior parte das espécies heterostílicas são distílicas, de modo que um dos morfos apresenta as anteras altas e o estigma baixo (morfo brevistilo) e o outro possui o estigma alto e as anteras baixas (longistilo) (Darwin 1877). Nessas plantas, a posição dos órgãos reprodutivos, especificamente as anteras e os estigmas, de cada morfo se encontram em alturas correspondentes ao morfo oposto (hercogamia recíproca), afim de potencializar a reprodução cruzada (Darwin 1877, Barrett & Cruzan 1994, Lloyd & Webb 1992a). Além do arranjo morfológico, as plantas distílicas, geralmente, apresentam um sistema de incompatibilidade heteromórfico, no qual a formação de frutos e sementes ocorre após cruzamentos entre morfos (polinizações legítimas) (Ganders 1979, Bawa & Beach 1983, Barrett 2002). Nessas populações distílicas, esses mecanismos morfológicos (hercogamia recíproca) e fisiológicos (sistema de incompatibilidade) geralmente levam a uma frequência equilibrada (isopleτία 1:1 em distília ou 1:1:1 em tristília) dos morfos florais como resultado da seleção dependente da frequência (Fischer 1941, Ganders 1979). Esse fato ocorre devido ao

morfo brevistilo se manifestar na forma heterozigota e o longistilo na homozigota recessiva com um alelo dominante (*S*) e recessivo (*s*) em único locus governando a manifestação dos morfos (Fischer 1941). Conjuntamente a isso, os morfos de espécies distílicas também podem apresentar diferenças em alguns caracteres que são descritos como auxiliares ao polimorfismo, tais como o tamanho e forma dos estigmas, anteras e grãos de pólen (Ganders 1979, Dulberger 1992).

A distília foi reportada em 26 das 28 famílias heterostílicas, incluindo a família Rubiaceae (Naiki 2012). Essa família é a quarta família mais representativa dentre as angiospermas, conhecida por apresentar aproximadamente cerca de 650 gêneros e 12.000 espécies de distribuição Pantropical (Delprete et al. 2004). Nos neotrópicos, é a maior família de Eudicotiledôneas com cerca de 200 gêneros e 5.000 espécies (Delprete et al. 2004). No Brasil, sua representatividade é grande, pois possui, aproximadamente, 125 gêneros e 1.405 espécies (Flora do Brasil em construção 2020). Após diversos estudos e diferentes classificações de alguns pesquisadores, Bremer & Eriksson (2009) consideraram, filogeneticamente, a família subdividida em três subfamílias monofiléticas, sendo elas Ixoroideae, Cinchonoideae e Rubioideae. Em Rubioideae, está presente a tribo Psychotrieae, na qual os gêneros do presente estudo, *Psychotria* L. e *Palicourea* Aubl., estão inseridos. Além disso espécies desses dois gêneros são comumente encontradas nos mesmos locais, sobretudo partilhando dos mesmos grupos de polinizadores, tais como abelhas e beija-flores (Mesquita et al. 2018).

A hipótese evolutiva da distília foi descrita primeiramente por Darwin (1877) em sua obra “*The different forms of flowers in plants of the same species*”. Segundo a teoria, a hercogamia recíproca surgiu como uma forma de melhorar a transferência de pólen entre os morfos e diminuir o fluxo de pólen ilegítimo (entre flores do mesmo indivíduo ou do mesmo morfo). A partir dessa hipótese, dois modelos evolutivos mais relevantes foram propostos: (A) Charlesworth & Charlesworth (1979a, b) propuseram que a pressão da autogamia selecionou, primeiramente, o sistema de incompatibilidade e que a hercogamia recíproca surgiu secundariamente como uma forma de potencializar o fluxo de pólen compatível entre os morfos; (B) Lloyd & Webb (1992a, b) propuseram que a hercogamia recíproca antecedeu, evolutivamente, o sistema de incompatibilidade e que a flor ancestral apresentava a morfologia das flores longistilas (denominado hercogamia de aproximação), tendo a hercogamia recíproca uma função primordial de potencializar a transferência de pólen entre os morfos, além disso a origem desses dois mecanismos ocorreram de forma independente. Diferentes estudos filogenéticos e funcionais já demonstraram que o caminho percorrido no segundo modelo faz

mais sentido (Pérez-Barrales et al. 2006, Ferrero et al. 2009, Ferrero et al. 2012, Keller et al. 2014, Zhou et al. 2015, Valois-Cuesta et al. 2011, Jiang et al. 2018), contudo a evolução desse sistema na família Rubiaceae ainda permanece desconhecida, devido a falta de informações morfológicas, ecológicas e funcionais. Por esta razão, fornecer informações sobre as características distílicas de diferentes espécies de *Psychotria* e *Palicourea* são essenciais, pois essas informações serão de grande utilidade para a realização de futuros estudos evolutivos com essa família.

A hercogamia recíproca apresenta variações em seus níveis, devido a isso a reciprocidade perfeita é, raramente, descrita em populações distílicas (Hernández & Ornelas 2007, Valois-Cuesta et al. 2011, Ferrero et al. 2011a, Sá et al. 2016, Jacquemyn et al. 2018). A forma como a hercogamia recíproca vem sendo numericamente calculada é assunto de grandes discussões, pois vários índices foram propostos até o momento e estes sempre foram alvos de questionamentos, devido as suas vantagens e desvantagens (Richards & Koptur 1993, Faivre & McDade 2001, Lau & Bosque 2003, Sánchez et al. 2008, 2013). Uma métrica mais vantajosa que se baseia na acurácia adaptativa relaciona a morfologia floral com o potencial reprodutivo (Armbruster et al. 2009, Armbruster et al. 2017). Os autores propõem uma medida de inacurácia que avalia o custo adaptativo do fenótipo analisado com o valor do fenótipo do ótimo (e.g. valor médio do órgão recíproco com a variação do outro órgão em torno desta média). Isso significa que o pólen de um respectivo morfo poderá ser depositado sobre o estigma do morfo oposto se o posicionamento de ambos estiverem no mesmo nível ou próximos, sendo o valor de inacurácia (reciprocidade) baseado a partir da posição dos estigmas e anteras de toda a população em comparação com a posição do ótimo (Armbruster et al. 2017). Esse cálculo é recente e portanto poucos trabalhos utilizaram desse método, contudo ele está sendo bem aceito pela comunidade científica (Armbruster et al. 2017, Jacquemyn et al. 2018, Matias 2018). Além de ser mais vantajoso do ponto de vista métrico, esse cálculo também permite investigar quais componentes (variações da antera e estigma e o viés maladaptativo) interferem de forma mais contundente nos níveis reciprocidade (imprecisão dos órgãos) (Armbruster et al. 2017). Dessa forma, é possível relacionar diretamente as respectivas contribuições de cada um dos componentes para os níveis de reciprocidade final. Por sua vez, os componentes relacionados nesse cálculo, como altura da antera e estigma, podem ser afetados por fatores ecológicos/morfológicos, tais como, polinizadores, comprimento da corola e a proporção dos morfos (Hodgins & Barrett 2008, Keller et al. 2012, Sá et al. 2016, Novo et al. 2018, Wu et al. 2018). Conseqüentemente, variações encontradas nesses traços ecológicos e morfológicos podem afetar indiretamente os níveis de hercogamia recíproca. No entanto, essa relação direta de fatores ecológicos (interação

planta-polinizador) e morfológicos (traços florais) com a hercogamia recíproca ainda não foi testado em plantas distílicas. Deste modo, estudos nesse sentido são importantes para que possam fornecer informações sobre como a reciprocidade é modulada em plantas distílicas.

Gerar conhecimento sobre as possíveis causas das variações em traços florais das plantas é essencial, pois permite compreender os processos e padrões que estão relacionados com a evolução adaptativa (MacColl 2011). Em espécies distílicas, diferenças no comprimento da corola entre os morfos já foram relatadas em vários níveis, desde maiores no brevistilo, no longistilo, e até ausência de diferença (Ganders 1979, Richards & Koptur 1993, Faivre & McDade 2001, Consolaro et al. 2009, Santos-Gally et al. 2015). Estudos realizados com espécies de *Primula* L. (Primulaceae) e *Psychotria* encontraram que essa variação no comprimento da corola apresentou um efeito no comprimento dos órgãos sexuais, sobretudo na altura das anteras, devido aos estames serem epipétalos (fusionados na corola) (Keller et al. 2012, Sá et al. 2016, Novo et al. 2018). Alguns autores destacam que essas variações na morfologia devam estar associadas a pressões seletivas que favoreçam melhores níveis de reciprocidade (Thompson & Dommée 2000, Ferrero et al. 2011b). Dessa forma, é plausível acreditar que a corola é um dos principais fatores que afetam os níveis de reciprocidades em plantas distílicas. Por sua vez, estudos nesse sentido ainda não foram realizados, sobretudo em espécies de *Palicourea* e *Psychotria* que apresentam traços florais complexos como corolas tubulares e estames epipétalos.

O fato dessas espécies apresentarem corola tubular determina o espectro de visitantes florais a partir de restrições ao comportamento do polinizador durante o seu forrageamento, pois limita a proboscíde/bico a seguir um único caminho durante as visitas (Lloyd & Webb 1992a, Santos-Gally et al. 2013, Costa et al. 2017). Esse comportamento pode resultar em uma maior eficiência na deposição de pólen legítimo no morfo brevistilo, pois o espaço disponível para o polinizador forragear é mais limitado quando se comparado com o morfo longistilo (Lloyd & Webb 1992a, Santos-Gally et al. 2013, Costa et al. 2017). Além das características da corola, as variações nos níveis de reciprocidade também têm sido relatados como fatores que afetam essa deposição de grãos de pólen legítimos sobre os estigmas de ambos os morfos (Jacquemyn et al. 2018, Brys & Jacquemyn 2019). Em espécies distílicas espera-se que a deposição de grãos de pólen legítimo seja semelhante sobre as superfícies estigmáticas dos morfos longistilo e brevistilo, pois um fluxo de pólen assimétrico contínuo pode levar esse polimorfismo floral a um colapso reprodutivo (e.g. perda dos padrões distílicos) (Faivre & McDade 2001, Lau & Bosque 2003, Barrett & Shore 2008). Nesse sentido, a funcionalidade da distílica tem sido descrita como a relação da hercogamia recíproca com a atuação dos

polinizadores em transportarem grãos de pólen legítimos entre os morfos florais (Ferrero et al. 2011).

Diversos trabalhos a respeito do fluxo de pólen em plantas distílicas já foram feitos e a assimetria foi mais comumente encontrada do que a simetria, sendo as falhas nos níveis de reciprocidade a principal relação levantada para o desequilíbrio (Stone 1995, Ree 1997, Lau & Bosque 2003, García-Robledo 2008, Valois-Cuesta et al. 2011). No entanto, em sua maioria, os trabalhos foram desenvolvidos em populações isoladas ou os dados não buscaram uma relação direta entre a variação da reciprocidade com a deposição de pólen legítimo. O novo índice proposto para calcular a reciprocidade (Armbruster et al. 2009, Armbruster et al. 2017), permite verificar o grau de inacurácia para cada flor, possibilitando relacionar assim os valores de reciprocidade com a deposição de pólen legítimo (Armbruster et al. 2017). Até o momento, apenas o estudo com espécies de *Pulmonaria* (Boraginaceae; Jacquemyn et al. 2018) testou essa relação. Em Rubiaceae, família que possui mais representantes distílicos dentre todas as famílias, isso ainda não foi realizado. Estudos morfológicos com espécies desta família, especificamente com os gêneros *Psychotria* e *Palicourea*, têm demonstrado grandes variações nos níveis de hercogamia recíproca (Hernández & Ornelas 2007, Valois-Cuesta et al. 2011, Sampson & Krebs 2012, Matias et al. 2016, Sá et al. 2016), o que torna os gêneros excelentes modelos para investigar a relação da hercogamia recíproca com o fluxo de pólen em espécies distílicas.

Os polinizadores têm sido reconhecidos como importantes agentes seletivos na evolução de sistemas distílicos e cada grupo de polinizador pode exibir pressões seletivas distintas dentro de uma mesma espécie vegetal (Pérez-Barrales et al. 2006), de modo que já foi demonstrado que esses agentes podem selecionar diferentes traços florais (e.g. largura e comprimento da corola) dependendo da sua atuação em cada população (Wu et al. 2018). Populações dos gêneros *Psychotria* e *Palicourea* apresentam diferentes grupos de polinizadores, tais como beija-flores, abelhas, mariposas, borboletas, vespas e moscas (Faivre & McDade 2001, Hernandez & Ornelas 2007, Consolaro et al. 2009, Consolaro et al. 2011, Faria & Araújo 2016, Sá et al. 2016, Watanabe et al. 2018). É sabido que alguns polinizadores podem ter um desempenho melhor em transportar grãos de pólen para o morfo longistilo e outros para o morfo brevistilo, sendo que a presença de mais grupos de polinizadores podem assegurar o fluxo de pólen simétrico entre os morfos, mantendo os padrões distílicos (Deschepper et al. 2018). Assim, a riqueza da guilda de polinizadores encontrada nas flores de *Psychotria* e *Palicourea* possibilita a investigação sobre o real papel desses agentes no fluxo de pólen legítimo em plantas distílicas.

Quantificar a importância dos polinizadores para as plantas é uma questão chave para se identificar quais são os visitantes e quais são os reais polinizadores (King et al. 2013). Esse tipo de estudo se torna ainda mais importante em sistemas florais que dependem da eficácia dos polinizadores para o seu funcionamento, tais como a distília. Alguns trabalhos discutem que as abelhas e os beija-flores atuam de forma diferente na remoção e deposição de pólen em algumas espécies de plantas (Thomson et al. 2000, Castellanos et al. 2003). As aves (beija-flores) são tidas como melhores transportadores de pólen do que os insetos (abelhas), principalmente em locais com maiores altitudes, sugerindo que diferenças nas características florais e ambientais podem resultar em distintos padrões de reprodução dentro e entre populações, dependendo do contexto em que cada uma se encontra (Krauss et al. 2017, Lehmann et al. 2019). Por outro lado, uma gama de componentes florais e comportamentais estão envolvidos nessa relação planta-polinizador, o que torna difícil estimar a eficácia dos tipos de polinizadores (Herrera 1987, Young 1988, Gross 2005, Faria & Araújo 2015, King et al. 2013, Ballantyne et al. 2015). Recentemente, alguns autores têm considerado que a combinação da taxa de visita com a deposição de grãos de pólen sobre o estigma é uma boa métrica para se medir a eficácia dos diferentes grupos de polinizadores (Freitas 2013, King et al. 2013, Ballantyne et al. 2015, Lehmann et al. 2019). Por esta razão, o presente estudo adotou esses componentes para investigar o papel de cada tipo de polinizador em plantas distílicas.

Embora ao longo dos últimos anos vários estudos tenham fornecido informações relevantes a respeito das características distílicas em espécies de *Palicourea* e *Psychotria*, nenhum trabalho com uma visão mais ampla foi realizado. Sobretudo, no âmbito de compreender quais fatores interferem nas variações da hercogamia recíproca e se a funcionalidade desse mecanismo, de fato, ocorre por intermédio dos diferentes grupos de polinizadores. Dessa forma, o presente trabalho buscou investigar quais fatores morfológicos e ecológicos afetam as variações da hercogamia recíproca em espécies de *Palicourea* e *Psychotria*. Também foi analisado se melhores níveis de reciprocidade e se diferentes grupos de polinizadores têm efeito no fluxo de pólen legítimo e no sucesso reprodutivo dessas plantas. A tese está organizada em três capítulos, todos usando como modelo espécies/populações de *Palicourea* e *Psychotria*. O primeiro capítulo foi realizado a partir de dados da literatura, de modo que foi analisado as variações da reciprocidade, buscando compreender quais componentes da inacurácia mais contribuem para essas variações, conjuntamente a isso foi investigado quais fatores ecológicos e morfológicos afetam os níveis de reciprocidade. Especificamente, no segundo capítulo os dados foram coletados em campo em três áreas diferentes, de maneira que foi analisado se a hercogamia recíproca, o comprimento do lobo do

estigma e os polinizadores têm algum efeito na deposição de grãos de pólen legítimo. Por fim, o terceiro capítulo utilizou uma população como modelo para testar a eficácia dos polinizadores (beija flores e abelhas) na deposição de pólen em partes específicas no corpo dos polinizadores e no sucesso reprodutivo. A proposta desta tese foi fornecer informações substanciais sobre a distíla, sobretudo avaliando diferentes aspectos relacionados com o principal traço evolutivo desse sistema floral, a hercogamia recíproca.

REFERÊNCIAS

- Armbruster, W.S. Hansen, T.F.; Pélabon, C.; Pérez-Barrales, R. & Maad, J. 2009. The adaptive accuracy of flowers: measurement and microevolutionary patterns. *Annals of Botany* 103: 1529–1545.
- Armbruster, W.S.; Bolstad, G.H.; Hansen, T.F.; Keller, B.; Conti, E. & Pélabon, C. 2017. The measure and mismeasure of reciprocity in heterostylous flowers. *New Phytologist* 215: 906–917.
- Ballantyne, G.; Baldock, K.C.R. & Willmer, P.G. 2015. Constructing more informative plant–pollinator networks: visitation and pollen deposition networks in a heathland plant community. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 282: 14–22.
- Barrett, S.C.H. & Cruzan, M.B. 1994. Incompatibility in heterostylous plants. In: Williams, E.G.; Clarke, A.E.; Knox, R.B. eds. *Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants*. Massachusetts: Kluwer Boston, 188-219.
- Barret, S.C,H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* 3: 274-284.
- Barrett, S.C.H. & Shore, J.S. 2008. New Insights on Heterostyly: Comparative Biology, Ecology and Genetics. In: Franklin-Tong, V.E. (ed.) *Self-incompatibility in flowering plants-evolution, diversity, and mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 3-32.
- Bawa, K.S. & Beach, J.H. 1983. Self-Incompatibility Systems in the Rubiaceae of a Tropical Lowland Wet Forest. *American journal of botany* 70: 1281-1288.

- Bawa, K.S.; Perry, D.R. & Beach, J.H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees I. Sexual system and incompatibility mechanisms. *American Journal of Botany* 72: 331-345.
- Bremer, B. 2009. A review of molecular phylogenetic studies of Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96: 4-26.
- Bremer, B. & Eriksson, T. 2009. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. *International Journal of Plant Sciences* 170: 766–793.
- Brys, R. & Jacquemyn, H. 2019. The impact of individual inaccuracy of reciprocal herkogamy on legitimate pollen deposition and seed set in a distylous self-incompatible herb. *Journal of ecology* doi: 10.1111/1365-2745.13258.
- Cardoso, J.C.F; Viana, M.L.; Matias, R.; Furtado, M.T.; Caetano, A.P.D.S.; Consolaro, H. & Brito, V.L.G.D. 2018. Towards a unified terminology for angiosperm reproductive systems. *Acta Botanica Brasilica* 32: 329-348.
- Castellanos, M.C.; Wilson, P. & Thomson, W.J.D. 2003. Pollen transfer by hummingbirds and bumblebees, and the divergence of pollination modes in *Penstemon*. *Evolution* 12: 2742–2752.
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. 1979a. A model for the evolution of distyly. *The American Naturalist* 114:467–498.
- Charlesworth, B. & Charlesworth, D. 1979b. The maintenance and breakdown of distyly. *The American Naturalist* 114:199–513.
- Consolaro, H.; Toledo, R.D.P.; Ferreguti, R.L.; John, H. Oliveira, P.E. 2009. Distilia e homostilia em espécies de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) do Cerrado do Brasil Central. *Revista Brasileira de Biociências* 32: 677-689.
- Consolaro, H.; Silva, S.C.S. & Oliveira, P.E. 2011. Breakdown of distyly and pin-monomorphism in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Plant Species Biology* 26: 24-32.
- Costa, J.; Castro, S.; Loureiro, J. & Barrett SCH. 2017. Experimental insights on Darwin's cross-promotion hypothesis in tristylous purple loosestrife (*Lythrum salicaria*). *American Journal of Botany* 104: 616-626.

- Darwin, C. 1877. The Different Form of Flowers of the Same Species. John Murray, London.
- Delprete, P.G. 2004. Rubiaceae. In N. Smith, S.A., Mori, A., Henderson, D.W.M. & Heald, S.V. Flowering plants of the neotropics. Princeton and Oxford, New Jersey, The New York Botanical Garden. Princeton University Press. p. 328-333.
- Deschepper, P.; Brys, R. & Jacquemyn, H. 2018. The impact of flower morphology and pollinator community composition on pollen transfer in the distylous *Primula veris*. Botanical Journal of the Linnean Society 186: 414-424.
- Dulberger, R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In: Barrett, S.C.H. ed. Evolution and Function of Heterostyly. Berlin: Springer-Verlag, 41-84.
- Faivre, A.E. & McDade, L.A. 2001. Population-level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of anthers and stigmas characterize heterostyly? American Journal of Botany 88: 841–853.
- Faria, R.R. & Araújo, A.C. 2015. Fruit set of distylous *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae) mediated by *Apis mellifera* (Apidae) and species of Augochloropsis (Halictidae). Acta Botanica Brasilica 29: 278–281.
- Faria, C.R.R. & Araújo, A.C. 2016. Flowering phenology and floral visitors in distylous populations of *Psychotria carthagenensis* (Rubiaceae) in Brazilian Cerrado. Annals of the Missouri Botanical Garden 101: 636-647.
- Ferrero, V.; Arroyo, J.; Vargas, P.; Thompson, J.D. & Navarro, L. 2009. Evolutionary transitions of style polymorphisms in *Lithodora* (Boraginaceae). Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 11: 111-125.
- Ferrero, V.; Castro, S.; Sánchez, J.M. & Navarro, L. 2011a. Stigma–anther reciprocity, pollinators, and pollen transfer efficiency in populations of heterostylous species of *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). Plant Systematics and Evolution 291:267–276.
- Ferrero, V.; Chapela, I.; Arroyo, J. & Navarro, L., 2011b. Reciprocal style polymorphisms are not easily categorised: the case of heterostyly in *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). Plant Biology 13: 7–18.

- Fisher, R.A. 1941. The theoretical consequences of polyploid inheritance for the mid style form of *Lythrum salicaria*. *Annals of Eugenics* 11: 31-38.
- Freitas, L. 2013. Concepts of pollinator performance: is a simple approach necessary to achieve a standardized terminology? *Brazilian Journal of Botany* 36: 3–8.
- Ganders, F.R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607-635.
- García-Robledo, C. 2008. Asymmetry in pollen flow promotes gender specialization in morphs of the distylous neotropical herb *Arcytophyllum lamarum* (Rubiaceae). *Evolutionary Ecology* 22: 743-755.
- Gross, P. 2005. Pollination effectiveness. In: Dafni A, Kevan PG, Husband BC. (eds.) *Practical Pollination Biology*. Cambridge, Enviroquest Ltd.
- Herrera, C.M. 1987. Components of pollination “quality”: comparative analysis of a diverse insects assemblage. *Oikos* 50: 79-90.
- Hernández, A. & Ornelas, J.F. 2007. Disassortative pollen transfer in distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a hummingbirds-pollinated shrub. *Écoscience* 14: 8-16.
- Hodgins, K.A. & Barrett, S.C.H. 2008. Asymmetrical mating patterns and the evolution of biased style-morph ratios in a tristylous daffodil. *Genetics Research* 90: 3-15.
- Jacquemyn, H.; Gielen, M. & Brys, R. 2018. Is sexual organ reciprocity related to legitimate pollen deposition in distylous *Pulmonaria* (Boraginaceae)? *Oikos* 127: 1216-1224.
- Jiang, X-F.; Zhu, X-F. & Li, Q-J. 2018. Variation in the degree of reciprocal herkogamy affects the degree of legitimate pollination in a distylous species. *AoB PLANTS* 10: ply022.
- Keller, B.; De Vos, J.M. & Conti, E. 2012. Decrease of sexual organ reciprocity between heterostylous primrose species, with possible functional and evolutionary implications. *Annals of botany* 110: 1233-1244.
- Keller, B.J.; Thomson, D. & Conti, E. 2014. Heterostyly promotes disassortative pollination and reduces sexual interference in Darwin’s primroses: Evidence from experimental studies. *Functional Ecology* 28: 1413-1425.

- King, C.; Ballantyne, G. & Willmer, P.G. 2013. Why flower visitation is a poor proxy for pollination: measuring single-visit pollen deposition, with implications for pollination networks and conservation. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 811–818.
- Krauss, S.L.; Phillips, R.D.; Karron, J.D.; Johnson, S.D.; Roberts, D.G. & Hopper, S.D. 2017. Novel consequences of bird pollination for plant mating. *Trends in Plant Science* 22: 395–410.
- Lau, P. & Bosque, C. 2003. Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae): an experimental test of the Disassortative Pollen Flow Hypothesis. *International Association for Ecology* 135:593–600.
- Lehmann, L.J.; Maruyama, P.K.; Bergamo, P. J.; Maglianesi, M.A.; Rahbek, C. & Dalsgaard, B. 2019. Relative effectiveness of insects versus hummingbirds as pollinators of Rubiaceae plants across elevation in Dominica, Caribbean. *Plant Biology* 21: 738–744.
- Lloyd, D.G. & Webb, C.J. 1992a. The evolution of heterostyly. In: Barrett SCH, ed. *Evolution and function of heterostyly*. Berlin: Springer-Verlag, 151-178.
- Lloyd, D. & Webb, C. 1992b. The selection of heterostyly. *Evolution and Function of Heterostyly* 15:179–207.
- MacColl, A.D. 2011. The ecological causes of evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 26:514–522.
- Matias, R.; Oliveira, A.S.; Furtado, M.T.; Sá, T.; Rodrigues, E.B.; Oliveira, P.E. & Consolaro, H. 2016. Sistema reprodutivo atípico de duas espécies de Rubiaceae: distilia com autoincompatibilidade parcial no morfo brevistilo? *Rodriguésia* 67: 357-368.
- Matias, R. Heterostilia e especialização sexual em espécies de *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) no cerrado do Brasil central. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Botânica, 126 p.
- Massinga, P.H.; Johnson, S.D. & Harder, L.D. 2005. Heteromorphic Incompatibility and Efficiency of Pollination in Two Distylous *Pentanisia* Species (Rubiaceae). *Annals of botany* 95: 389-399.
- Naiki, A. 2012. Heterostyly and the possibility of its breakdown by polyploidization. *Plant Species Biology* 27:3–29.

- Nepokroeff, M.; Sytsma, K.J. & Bremer, B. 1999. Reorganization of the genus *Psychotria* and tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and rbcL sequence data. *Systematic Botany* 24:5–27.
- Novo, R.R.; Consolaro, H.; Almeida, N.M. & Castro, C.C. 2018. Floral biology of the velvetseed *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae): Atypical distyly or style dimorphism? *Flora* 239: 62-70.
- Pérez-Barrales, R.; Vargas, P. & Arroyo, J. 2006. New evidence for the Darwinian hypothesis of heterostyly: breeding systems and pollinators in *Narcissus* sect. Apodanthi. *New Phytologist* 171: 553-567.
- Ree, R.H. 1997. Pollen Flow, Fecundity, and the Adaptive Significance of Heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Biotropica* 29: 298-308.
- Richards, J.H. & Koptur, S. 1993. Floral Variation and distyly in *Guettarda scraba* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 80: 31-40.
- Sá, T.; Furtado, M.T.; Ferrero, V.; Pérez-Barrales, R.; Rodrigues, E.B.; Santos, I.G. & Consolaro, H. 2016. Floral biology, reciprocal herkogamy and breeding system in four *Psychotria* species (Rubiaceae) in Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 182: 689–707.
- Sampson, D.A. & Krebs, R.A. 2012. Quantitative evaluation of reciprocal herkogamy in the distylous species, *Hedyotis caerulea* (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 298: 1361-1370.
- Sánchez, J.M.; Ferrero, V. & Navarro, L. 2008. A new approach to the quantification of degree of reciprocity in distylous (*sensu lato*) plant populations. *Annals of Botany* 102: 463-472.
- Sánchez, J.M.; Ferrero, V. & Navarro, L. 2013. Quantifying reciprocity in distylous and tristylous plant populations. *Plant Biology* 15: 616–620.
- Santos-Gally, R.; Gonzalez-Voyer, A. & Arroyo, J. 2013. Deconstructing heterostyly: The evolutionary role of incompatibility, pollinators, and floral architecture. *Evolution* 67: 2072-2082.

- Santos-Gally, R.; Castro, A.; Pérez-Barrales, R. & Arroyo, J., 2015. Styler polymorphism on the edge: unusual flower traits in Moroccan *Narcissus broussonetii* (Amaryllidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 177: 644–656.
- Sauquet, H.; von Balthazar, M.; Magallon, S.; Doyle, J.; Endress, P.; Bailes, E.; de Morais, E.; Bull-Hereñu, K.; Carrive, L.; Chartier, M.; Chomicki, G.; Coiro, M.; Cornette, R.; Ottra, J.; Epicoco, C.; Foster, C.; Jabbour, F.; Haevermans, A.; Haevermans, T. & Schönenberger, J. 2017. The ancestral flower of angiosperms and its early diversification. *Nature Communications* 8: 16047.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2005. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseada em APG II*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.
- Stone, J.L. 1995. Pollen Donation Patterns in a Tropical Distylous shrub *Psychotria suerrensis*; Rubiaceae. *American Journal of Botany* 82: 1390-1398.
- Thompson, J.D. & Dommée, B. 2000. Morph-specific patterns of variation in stigma height in natural populations of distylous *Fasminum fruticans*. *New Phytologist* 148: 303–314.
- Thomson, J. D.; Wilson, P.; Valenzuela, M. & Malzone, M. 2000. Pollen presentation and pollination syndromes, with special reference to *Penstemon*. *Plant Species Biology* 15: 11–29.
- Valois-Cuesta, H.; Soriano, P.J. & Ornelas, J.F. 2011. Asymmetrical legitimate pollination in distylous *Palicourea demissa* (Rubiaceae): the role of nectar production and pollinator visitation. *Journal of Tropical Ecology* 27:393–404.
- Watanabe, K.; Kato, H.; Kuraya, E. & Sugawara T. 2018. Pollination and reproduction of *Psychotria homalosperma*, an endangered distylous tree endemic to the oceanic Bonin (Ogasawara) Islands, Japan. *Plant Species Biology* 33: 16-27.
- Webb, C.J. & Lloyd, D.G. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24:163-178.
- Wu, Y.; Zhong, T.; Zhang, Z-Q. & Li Q-J. 2018. Pollinator-mediated selection on floral traits varies in space and between morphs in *Primula secundiflora*. *AoB PLANTS* 10: ply059.

- Young, H.J. 1988. Differential importance of beetle species pollinating *Dieffenbachia longispatha* (Araceae). *Ecology* 69: 832-844.
- Zhou, W.; Barrett, S.C.H.; Wang, H. & Li, D.Z. 2015. Reciprocal herkogamy promotes disassortative mating in a distylous species with intramorph compatibility. *New Phytologist* 206: 1503-1512.

CAPÍTULO I

Variações da hercogamia recíproca (inacurácia): Fatores que afetam esse mecanismo em espécies distílicas de Rubiaceae

RESUMO

A distília é um polimorfismo sexual, que apresenta dois morfos florais em uma mesma população (longistilo e brevistilo). Esse sistema floral é caracterizado principalmente por possuir os órgãos sexuais (anteras e estigmas) de cada morfo posicionados na mesma altura do outro morfo (hercogamia recíproca), promovendo assim a polinização cruzada entre os morfos. Por outro lado, evidências morfológicas mostram que espécies distílicas geralmente apresentam variações substanciais na reciprocidade entre morfos (órgãos altos; estigmas-L e anteras B) e baixos (estigmas-B e anteras-L). O objetivo deste trabalho foi investigar as variações da hercogamia recíproca em plantas distílicas de *Palicourea* e *Psychotria*, analisar quais componentes contribuem mais para as variações da hercogamia recíproca (cálculo da inacurácia) e testar diferentes fatores que podem explicar tais variações. Esse estudo foi realizado a partir de um levantamento bibliográfico, no qual foram coletados informações sobre o comprimento dos traços florais e de outros fatores adicionais. Posteriormente, foi utilizado o cálculo de acurácia adaptativa para estimar as variações da reciprocidade. Foi encontrado que a hercogamia recíproca não é diferente entre os gêneros, contudo é entre os órgãos, de modo que os baixos são mais recíprocos que os altos. Para o cálculo da inacurácia o viés maladaptativo (desvio do ótimo), foi o principal componente que contribuiu para a variação da reciprocidade, especialmente nos órgãos baixos. Entre todos os fatores selecionados apenas o coeficiente de variação da corola afetou os níveis de reciprocidade, no qual, conforme aumentava essa variação menor era a hercogamia recíproca. Os resultados deste trabalho demonstrou que a corola tem um papel muito importante na modulação da reciprocidade em espécies distílicas. Entretanto, acredita-se que variações resultantes dessa relação nem sempre podem ser malélicas para reprodução dessas plantas.

Palavras-chave: sistema floral; heterostilia; razão dos morfos; polinizadores; sistema de acasalamento; inacurácia; órgãos sexuais; traços florais; corola.

INTRODUÇÃO

Os polimorfismos sexuais surgiram várias vezes durante a evolução das angiospermas, sobretudo em resposta ao favorecimento da xenogamia em detrimento da autogamia (Darwin 1877, Barrett 2002). Atualmente, sabe-se que dentre as angiospermas a reprodução xenogâmica é o tipo mais comum de sistema de acasalamento, pois possibilita uma maior chance de

recombinação e manutenção da variabilidade genética (Oliveira & Maruyama 2014, Barrett & Harder 2017). A distília é um tipo de polimorfismo que apresenta dois morfos florais (longistilo e brevistilo), e que busca a reprodução cruzada entre estes tipos por meio físico e fisiológico (Webb & Lloyd 1986, Barrett & Shore 2008). Fisicamente, a distília busca a xenogamia por meio da hercogamia recíproca manifestada entre os morfo florais, pois estes morfos são caracterizados por possuírem estigmas altos e anteras baixos (morfo longistilo) e estigmas baixos e anteras altas (morfo brevistilo), de modo que essa arquitetura faz com que órgãos sexuais estejam posicionados de forma recíproca e favoreça a polinização cruzada por meio dos polinizadores (Lloyd & Webb 1992, Barrett & Cruzan 1994, Barrett 2002). Fisiologicamente, espécies distílicas são comumente acompanhadas por um sistema genético de incompatibilidade heteromórfico que previne a autogâmia e a geitonogâmia, de maneira que a frutificação só é possível quando o fluxo de pólen intermorfo é intermediado, eficientemente, pelos visitantes florais (Ganders 1979, Bawa & Beach 1983, Barrett 2002). Nesse sistema, cada indivíduo apresenta apenas um tipo floral, sendo esperado encontrar uma razão semelhante dos morfos nas populações (1:1, distílicas; 1:1:1, tristílicas) (Fischer 1941, Ganders 1979). Esse fato ocorre por esse sistema ser comumente controlado por um modelo simples de herança mendeliana, no qual um alelo dominante (*S*) e recessivo (*s*) segrega como um único locus governando a manifestação dos morfos (Fischer 1941).

Esse sistema floral faz parte de um polimorfismo maior, denominado heterostília, sendo registrado em aproximadamente 28 famílias de angiospermas (Naiki 2012). A distília é a forma mais comum da heterostília, encontrada em 26 famílias incluindo a família Rubiaceae (Barrett et al. 2000, Naiki 2012). Essa família é quarta maior dentre as angiospermas, sendo subdividida em três subfamílias monofiléticas, Ixoreae, Cinchonoideae e Rubioideae. Em Rubioideae, está presente a tribo Psychotrieae, na qual os gêneros do presente estudo, *Psychotria* e *Palicourea*, estão inseridos (Bremer & Eriksson 2009). Nesses gêneros a distília é tido como um caráter primitivo, dessa forma acredita-se que as variações no níveis da reciprocidade entre esses gêneros seja o mínimo possível, uma vez que a hercogamia recíproca é tido como a principal explicação para a evolução desse sistema floral (Darwin 1877, Lloyd & Webb 1992). Entretanto é sabido que muitas populações de espécies distílicas apresentam variações nos níveis de hercogamia recíproca (Hernández & Ornelas 2007, Valois-Cuesta et al. 2011, Ferrero et al. 2011, Sá et al. 2016). Essas variações podem estar associada com efeitos alométricos das características da flores conjuntamente com a atuação dos polinizadores (Santos-Gally et al. 2013, Wu et al. 2018). Um cálculo desenvolvido recentemente para investigar a reciprocidade em espécies heterostílicas, possibilita investigar quais componentes

(variações da antera e estigma e o viés maladaptativo) contribui mais para a imprecisão do posicionamento dos órgãos (ver detalhes em material e métodos) (Armbruster et al. 2017). Esse método é importante pois é o primeiro a expressar as contribuições em uma escala comum, permitindo assim a comparação direta das respectivas contribuições de cada um dos componentes para os níveis de reciprocidade final. Contudo após esse primeiro trabalho nenhum outro estudo foi realizado para testar a contribuição desses componentes e de outros fatores ecológicos/morfológicos nas variações dos padrões de reciprocidade em espécies distílicas.

As características diretamente relacionadas com esse cálculo, como altura da antera e estigma podem ser afetadas por fatores ecológicos/morfológicos, tais como, polinizadores, comprimento da corola, e a proporção dos morfos (Hodgins & Barrett 2008, Keller et al. 2012, Sá et al. 2016, Novo et al. 2018, Wu et al. 2018). Dessa forma é plausível acreditar que tais fatores também afetem os níveis da hercogamia recíproca dos órgãos altos, baixos e das populações. Como relatado a posição dos órgãos sexuais em espécies distílicas pode estar correlacionada a diferentes traços florais (e.g. comprimento e diâmetro do tubo da corola). Estudos realizados com espécies de *Primula* L. (Primulaceae) e *Psychotria* encontraram que o comprimento da corola apresentou um efeito no comprimento dos órgãos sexuais, sobretudo na altura das anteras, devido aos estames serem epipétalos (fusionados na corola) (Keller et al. 2012, Sá et al. 2016). Apesar do conhecimento ser escasso sobre o real papel da corola nos caminhos evolutivos da distília (ver Santos-Gally et al., 2013), acredita-se que as variações em sua morfologia estejam associadas a pressões seletivas que favoreçam melhores níveis de reciprocidade (Thompson & Dommée 2000, Ferrero et al. 2011).

Inúmeras investigações foram feitas com espécies e populações heterostílicas a fim de descrever as características fisiológicas e morfológicas além de elucidar possíveis implicações ecológicas, genéticas e evolutivas (Barrett 2002, Lau & Bosque 2003, Weller 2009, Cohen 2010, Consolaro et al. 2011, Rodrigues & Consolaro 2013, Sá et al 2016). Até onde se sabe, as variações nos padrões da hercogamia recíproca ainda não foram explicitamente testadas, sobretudo elucidando possíveis fatores ecológicos e morfológicos que interferem nessas variações. Nesse sentido os gêneros *Psychotria* e *Palicourea* (Rubiaceae) são excelentes modelos para se investigar tais variações, uma vez que estes gêneros apresentam alto grau de parentesco, além de serem reportados com grandes variações nos padrões de reciprocidade. Dessa forma o principal objetivo deste estudo foi analisar as variações da hercogamia recíproca em plantas distílicas desses dois gêneros, compreendendo quais componentes contribuem mais para essas variações e analisando quais possíveis fatores ecológicos e morfológicos afetam os

níveis de reciprocidade das populações, e dos órgãos altos e baixos. Para isso, três principais perguntas foram elaboradas: 1) A hercogamia recíproca é diferente entre os gêneros (*Psychotria* e *Palicourea*) e entre os órgãos (altos e baixos)?; e 2) Quais componentes da reciprocidade dos órgãos altos e baixos contribuiu mais para os níveis finais de reciprocidade de cada órgão? 3) Diferentes fatores como, proporção dos morfos, sistema de acasalamento, polinizadores, e o coeficiente de variação da corola tem efeito nos níveis de reciprocidade em plantas distílicas? Esses questionamentos são importantes pois vão elucidar como fatores morfológicos e ecológicos podem afetar a hercogamia recíproca, principal característica evolutiva do sistema distílico (Darwin 1877, Lloyd & Webb 1992).

MATERIAL E MÉTODOS

Levantamento bibliográfico – O banco de dados foi montado a partir de um levantamento realizado no Google Scholar e Web of Science, Scientific Electronic Library Online (SciELO). Dados de comunicação pessoal, teses e dissertações ainda não publicadas também foram adicionados ao banco de dados. Para a pesquisa foi utilizado as seguintes combinações de palavras-chaves encontradas nos títulos e resumos: heterostilia, distilia, polinização, hercogamia recíproca, e *Psychotria* e *Palicourea*. A busca também foi realizada a partir de palavras em inglês: heterostyly, distyly, pollination, and reciprocal herkogamy. Nesse estudo, foi utilizado apenas trabalhos de espécies que apresentavam os dois morfos nas populações e que continham os valores das alturas dos verticilos reprodutivos (anteras e estigma), dados essenciais para o cálculo da reciprocidade. As informações levantadas nos estudos foram as seguintes, gêneros (*Psychotria* e *Palicourea*), espécies, proporção dos morfos, sistema de acasalamento, quantidade de grupos de polinizadores, comprimento da corola e altura dos órgãos reprodutivos. Em alguns casos, os dados de uma mesma população foram levantadas em mais de um estudo, devido o partilhamento das informações em diferentes artigos. Ao total, foram levantados dados de 30 espécies de *Psychotria* e 12 de *Palicourea* (ver detalhes nos Resultados).

Inacurácia da reciprocidade – Para averiguar os níveis de hercogamia recíproca das populações e dos órgãos altos e baixos (Fig. 1), foi utilizado o cálculo proposto por Armbruster et al. (2017), que se baseia na teoria da relação da morfologia floral (órgãos reprodutivos) com o fitness

reprodutivo. Esse índice considera que se todas as anteras e estigmas compatíveis estiverem na mesma posição (ótima), a inacurácia será zero, demonstrando uma reciprocidade perfeita. Esse cálculo utiliza a média e a variância das alturas dos órgãos reprodutivos (anteras e estigmas) que geram valores de inacurácia, significado de imprecisão, que permite a comparação entre espécies, populações e órgãos. Assim, para a realização desses cálculos foram extraídos do banco de dados os valores médios (mm^2) das alturas das anteras e estigmas e seus desvios e erros padrões. Posteriormente, esses valores foram transformados em variância e, juntamente com a média, foi calculado os valores de inacurácia de cada população e órgão. Os valores de variância de cada órgão foram calculados da seguinte forma, 1) desvio padrão e 2) erro padrão, onde, D é o desvio padrão, E é o erro padrão e N é o número amostral.

$$1) \text{ Variância} = (D)^2$$

$$2) \text{ Variância} = (E * \sqrt{N})^2$$

A hercogamia recíproca para os órgãos altos e baixos foram estimadas a partir das equações descritas por Armbruster et al. 2017, onde, (A) representa a altura média das anteras altas (brevistilo), (S) é a altura média dos estigmas altos (longistilo), (a) representa a altura média das anteras baixas (longistilo), e (s) é altura média dos estigmas baixos (brevistilo). Dessa forma a reciprocidade (inacurácia) foi calculada para cada órgão como:

$$\text{Inacurácia}_{\text{órgãos altos}} = (\bar{A} - \bar{S})^2 + V_A + V_S$$

$$\text{Inacurácia}_{\text{órgãos baixos}} = (\bar{a} - \bar{s})^2 + V_a + V_s$$

onde, V_A , V_S , V_a e V_s representa a variância da altura dos órgãos respectivamente, letras com barra representa a média de cada órgão. A inacurácia total (população) foi estimada com base na soma das inacurácias dos órgãos altos e baixos.

A inacurácia dos órgãos altos e baixos são ainda mais decompostas, em viés maladaptativo², variância das anteras e variância dos estigmas. A soma desses três componentes corresponde ao valor final da inacurácia de cada órgão, e a soma dos seis componentes é igual ao total da inacurácia para a população. Nessa métrica o viés maladaptativo corresponde a primeira parte da fórmula, e representa a diferença entre a média das (anteras e estigmas)², neste caso quanto menor essa diferença menor será o desvio do ótimo, sendo que o ótimo é a reciprocidade perfeita. As variações das antera e dos estigmas corresponde o quanto esses órgãos variam em torno da média. Com base nesses três componentes é possível investigar o

quanto cada um destes contribui para a hercogamia recíproca final de cada órgão e da população. Como o estudo foi realizado com populações e espécies diferentes a inacurácia total, dos órgãos altos e baixos, e todos os componentes da inacurácia foram estandardizados a partir da média² das alturas das anteras e estigmas, afim de gerar um valor proporcional e comparativo (Armbruster et al. 2017). Nesse cálculo valores menores de inacurácia indicam melhores níveis de hercogamia recíproca (Armbruster et al. 2009, 2017).

Procedimentos – A razão dos morfos foi determinada a partir do número de indivíduos de cada morfo floral encontrado em cada população estudada. Foi realizado um cálculo de proporção dos morfos, no qual foram obtidos valores entre 0 e 1, sendo que valores próximos de 0.5 representava populações isopléticas.

O sistema de acasalamento é conhecido como a transmissão de genes de uma geração para outra através da reprodução sexual (fecundação). Dessa forma, o sistema de acasalamento de cada população foi também determinado através das informações dos testes de polinizações manuais, no qual a formação de pelo menos um fruto/semente em qualquer dos tratamentos realizados foi considerado como sucesso. Com base nesses resultados as populações foram definidas em categorias (xenogâmicas e/ou autogâmicas e/ou geitonogâmicas).

Os grupos de polinizadores foram determinados a partir das informações dos visitantes florais presentes em cada trabalho e, a partir desses relatos, foi definido para cada população de planta os grupos funcionais de polinizadores que estavam presentes (1, 2, 3 e 4 grupos), sendo os seguintes grupos funcionais encontrados: abelhas, beija-flores, moscas, mariposas, borboletas, vespas e formigas.

Com base no comprimento da corola de cada morfo foi calculado o coeficiente de variação (razão entre o desvio padrão e a média, multiplicado por 100) em cada população. O coeficiente de variação é uma boa medida para esse tipo de teste, pois permite comparar a variação de conjuntos de observações que são diferentes na média. Esse método permitiu testar o efeito da variação do comprimento das corolas nos níveis de hercogamia recíproca. Como as espécies distílicas apresentam dois morfos, a média entre os coeficientes de variação dos morfos brevistilo e longistilo foi utilizado como valor final para as análises.

Análises estatísticas – Uma análise de componentes principais (PCA) foi executada para investigar as variações da reciprocidade entre os gêneros, com intuito de investigar uma possível separação dos gêneros com relação a essas métricas analisadas. Nesta análise de PCA foram incluídas como variáveis a hercogamia recíproca estandardizada populacional, dos

órgãos altos e baixos. Para extrair e visualizar a saída das análises dos dados, foi utilizado o pacote “*ggfortify*” versão 0.4.7 (Horikoshi & Tang 2016) e “*factoextra*” versão 1.0.5 (Kassambara & Mundt 2017). Foi utilizada também uma análise adicional para averiguar se as variações da hercogamia recíproca (inacurácia) eram diferentes entre os gêneros, entre os tipos de órgãos (altos e baixos) e se ocorria interação entre esses fatores. Isso foi testado através de um modelo linear de efeito misto (LMM), no qual as espécies foram tratadas como fatores aleatórios, a fim de resolver a falta de independência dos dados e prevenir pseudoreplicação. Para isso, foi utilizado o pacote “*lme4*” versão 1.1-21 (Bates *et al.* 2018). A significância dos fatores fixos (gêneros e tipo de órgãos) foi analisada a partir do teste de variância do tipo II (Anova), através do pacote “*car*” versão 3.0-3 (Fox & Weisberg 2018). Para a variável resposta (inacurácia estandardizada) foi aplicado $\log(x)$ para melhorar as distribuições dos resíduos, e alcançar as premissas de normalidade e homocedasticidade dos dados.

A comparação entre os componentes da inacurácia para cada órgão (altos e baixos) foi feita a partir de dois modelos lineares generalizados de efeito mistos (GLMMs). Para isso foi utilizado a distribuição Gamma, pois essa é a melhor distribuição para dados contínuos que não alcançam as premissas de normalidade e homocedasticidade (Zuur *et al.* 2009). Para cada nível de órgão foram utilizados como variável resposta os valores dos componentes da inacurácia, e como variável preditora foram utilizados os tipos dos componentes. As espécies nesse modelo foram tratadas como fatores aleatórios. Para a realização dos modelos foram utilizados os pacotes “*lme4*” versão 1.1-21 (Bates *et al.* 2018), e para obter os valores de p para cada um dos fatores foi utilizado o pacote “*car*” versão 3.0-3 (Fox & Weisberg 2018). Quando detectada a significância dos fatores, foi utilizado um teste de contraste, através da função *lsmeans* com ajuste de Dunn, usando o pacote “*emmeans*” versão 1.4 (Length *et al.* 2019).

Para testar se os fatores tinham efeito na hercogamia recíproca (inacurácia), foram utilizados modelos lineares de efeito mistos, no qual a inacurácia estandardizada total e dos órgãos altos e baixos (reciprocidade) foram utilizadas como variáveis respostas, e a proporção dos morfos, o sistema de acasalamento, a quantidade de grupos de polinizadores, o coeficiente de variação do comprimento da corola e os gêneros foram utilizados como variáveis preditoras. Em todos os modelos as espécies foram utilizadas como fatores aleatórios. Com intuito de melhorar as distribuições dos resíduos nas variáveis respostas foram aplicados $\log(x)$ para se obter as premissas de normalidade e homocedasticidade dos dados. Para calcular a proporção da variância explicada por alguma variável que apresentou significância, foi utilizado o pacote “*MuMIn*” versão 1.43.6 (Bartoń 2019), no qual permite-se calcular o R^2 marginal para o efeito do fator fixo sozinho, e o R^2 condicional para todas as variáveis inclusive nos modelos (fatores

fixos e aleatórios) (Nakagawa et al. 2017). Para essa análise foram utilizados apenas 67 populações, pois eram as únicas que apresentaram informações sobre todas as variáveis predictoras. Todas as análises foram realizadas no programa R versão 3.6.0 (R Core Team 2019).

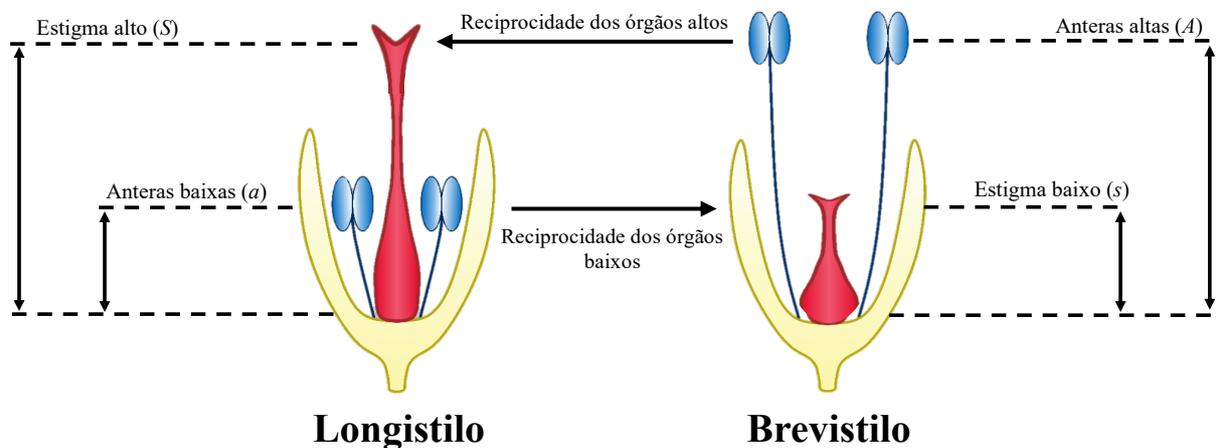


Figura 1. Esquema representativo da posição relativa dos órgãos sexuais (anteras e estigma) do morfo longistilo e brevistilo em espécies distílicas. Entre parêntese são as iniciais utilizadas para cada tipo de órgão nas análises da reciprocidade. Figura adaptada de Cardoso et al. (2018).

RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho foram retirados de 36 artigos, quatro dissertações de mestrado, duas teses de doutorado e de dados pessoais fornecidos por três grupos de pesquisas. Foram trabalhadas 42 espécies, sendo 30 de *Psychotria* e 12 de *Palicourea*. Ao todo, foram obtidas informações de 95 populações, sendo 58 de *Psychotria* e 37 de *Palicourea*, nos quais 69 foram de artigos, 16 de dissertações e teses, e 10 de grupos de pesquisas (Tab. S1). O resultado da análise de componentes principais (PCA), mostrou que os dois primeiros eixos de PCs representou 98.67 % (Fig. 2). Esse resultado indicou uma alta sobreposição entre os gêneros para todos os níveis de reciprocidade (total, dos órgãos altos e baixos) (Fig. 2).

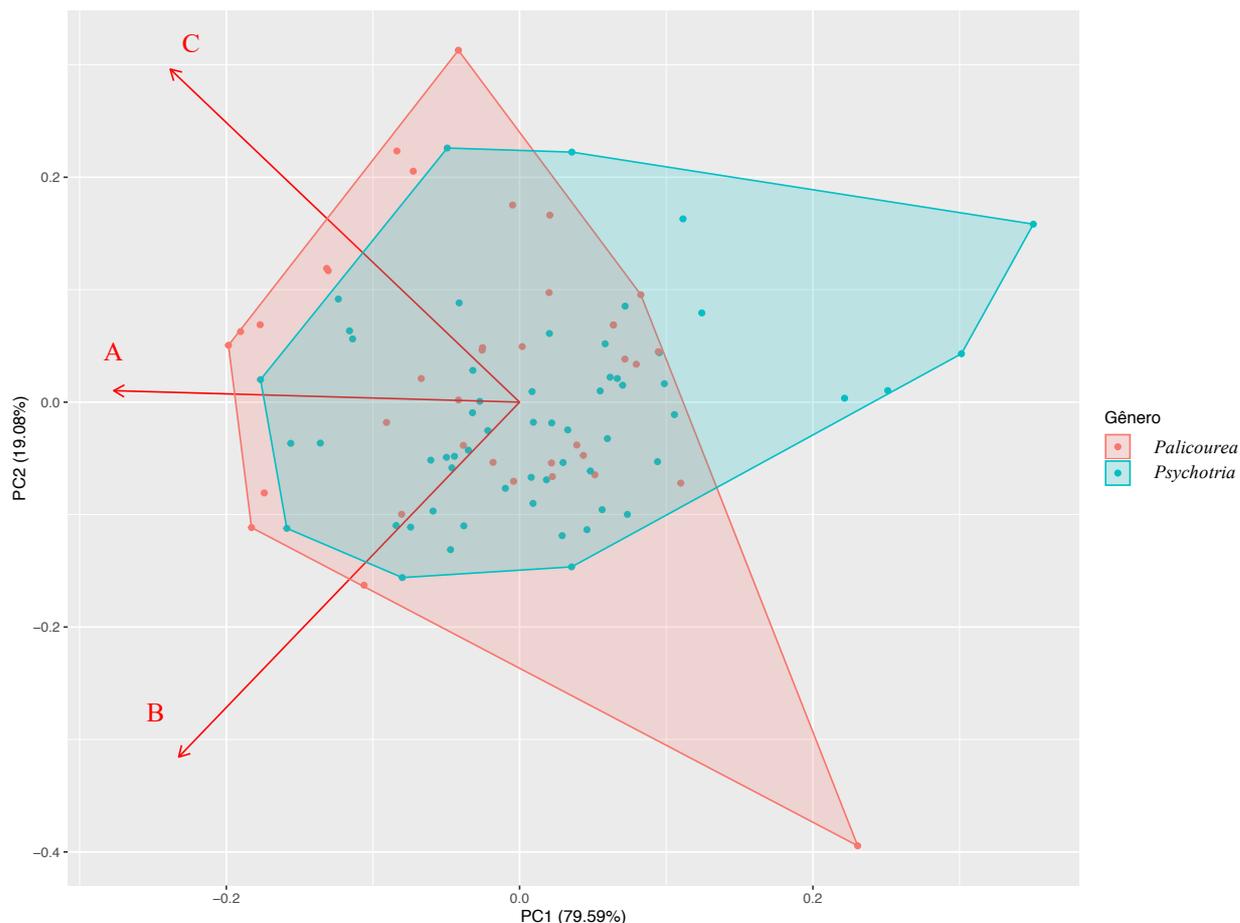


Figura 2. Resultado da análise de componente principal (PCA) usando os três níveis de hercogamia recíproca mensurados em populações dos gêneros *Palicourea* e *Psychotria*. (A) Reciprocidade total; (B) Reciprocidade dos órgãos altos; (C) Reciprocidade dos órgãos baixos.

Os valores da inacurácia total e dos órgãos altos e baixos de todas as populações e espécies estão sumarizados na Tabela S1. De acordo com o cálculo de inacurácia, os valores mais próximos de zero são os que representam maior reciprocidade, tanto para mm^2 quanto para porcentagem. Sendo assim, os níveis da inacurácia da reciprocidade das 95 populações avaliadas variaram entre 0.084mm^2 e 102.95mm^2 em uma escala métrica e entre 0.5 e 34.4 % em uma escala standardizada. A hercogamia recíproca não foi diferente entre os gêneros ($X^2=0.034$; $df=1$; $p=0.853$), entretanto variou entre os tipo de órgãos, de modo que os órgãos altos (5.06 ± 0.42) (média \pm erro padrão) foram menos recíprocos do que os órgãos baixos (4.86 ± 0.54) ($X^2=5.772$; $df=1$; $p<0.01$; $R^2m=0.029$, $R^2c=0.425$). O efeito da interação entre os gêneros e os tipos de órgãos não ocorreu, demonstrando que as variações da reciprocidade nos órgãos foi independentemente dos gêneros ($X^2=3.258$; $df=1$; $p=0.071$). A contribuição de cada componente variou para cada tipo de órgão, nos altos não houve diferença entre os

componentes, de modo que os valores de viés maladaptativo, variância dos estigmas e anteras foram semelhantes. Para os órgãos baixos, o viés maladaptativo foi o que mais contribuiu para a imprecisão (inacurácia final) desses órgãos, sendo que a variâncias dos estigmas e anteras contribuíram de forma semelhantes (Fig 3).

A proporção dos morfos, o sistema de acasalamento, e a quantidade de grupos de polinizadores não apresentaram efeito explicativo nos níveis de hercogamia recíproca total, dos órgãos altos e baixos (Tab. 1). Por outro lado, o coeficiente de variação da comprimento da corola demonstrou efeito em todos os níveis de reciprocidade, total ($X^2=6.913$; $df=1$; $p=0.009$, $R^2m=0.112$, $R^2c=0.727$), órgãos altos ($X^2=4.905$; $df=1$; $p=0.026$, $R^2m=0.160$, $R^2c=0.328$) e órgãos baixos ($X^2=4.068$; $df=1$; $p=0.043$, $R^2m=0.09$, $R^2c=0.813$), de modo que as populações e espécies com maiores variações no comprimento da corola foram as que apresentaram os piores níveis de hercogamia recíproca (Tab. 1; Fig. 4).

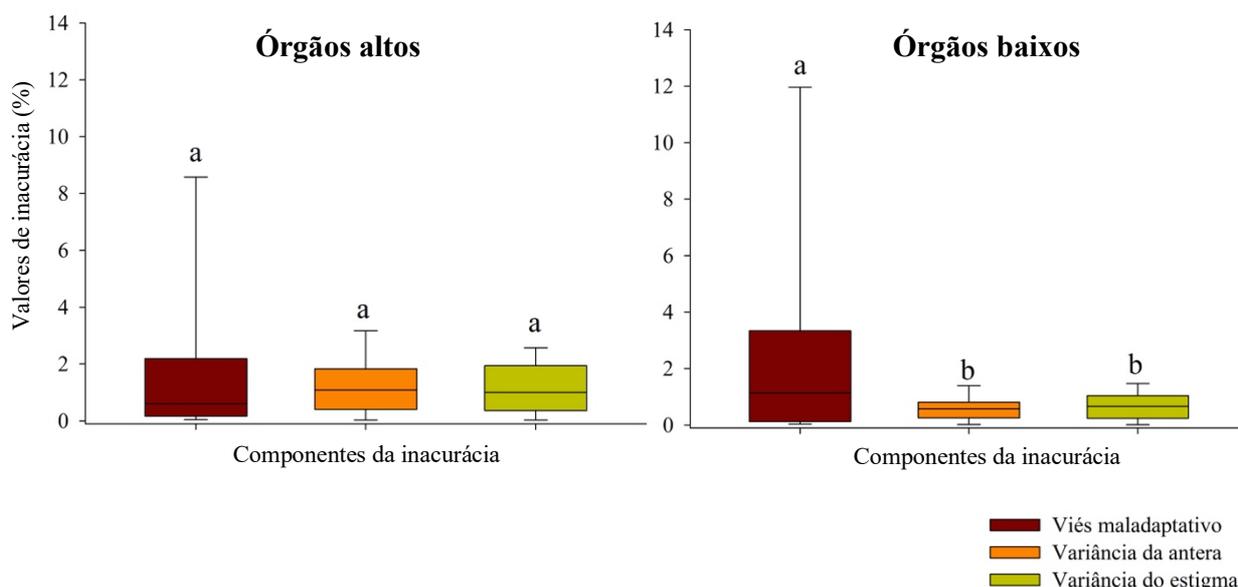


Figura 3. Valores da contribuição de cada componente da inacurácia para o valor final da reciprocidade de cada um dos órgãos. (A) Órgãos altos; (B) Órgãos baixos. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas ($p<0.05$) dentro de cada órgão.

A proporção dos morfos, o sistema de acasalamento, e a quantidade de grupos de polinizadores não apresentaram efeito explicativo nos níveis de hercogamia recíproca total, dos órgãos altos e baixos (Tab. 1). Por outro lado, o coeficiente de variação da comprimento da corola demonstrou efeito em todos os níveis de reciprocidade, total ($X^2=6.913$; $df=1$; $p=0.009$,

$R^2m=0.112$, $R^2c=0.727$), órgãos altos ($X^2=4.905$; $df=1$; $p=0.026$, $R^2m=0.160$, $R^2c=0.328$) e órgãos baixos ($X^2=4.068$; $df=1$; $p=0.043$, $R^2m=0.09$, $R^2c=0.813$), de modo que as populações e espécies com maiores variações no comprimento da corola foram as que apresentaram os piores níveis de hercogamia recíproca (Tab. 1; Fig. 4).

Tabela 1. Resultados do modelos lineares mistos (LMMs) realizados para testar o efeito das diferentes variáveis preditoras na hercogamia recíproca total, dos órgãos altos e baixos das populações de *Palicourea* Aubl. e *Psychotria* L. (Em negrito são as variáveis respostas).

Variáveis	X^2	df	p
Hercogamia recíproca total			
Proporção dos morfos	2.141	1	0.143
Sistema de acasalamento	1.902	2	0.386
Grupos de polinizadores	0.355	2	0.837
Coefficiente de variação da corola	6.913	1	0.009
Gêneros	1.259	1	0.261
Hercogamia recíproca órgãos altos			
Proporção dos morfos	0.945	1	0.331
Sistema de acasalamento	6.230	2	0.074
Grupos de polinizadores	1.767	2	0.413
Coefficiente de variação da corola	4.900	1	0.026
Gêneros	0.039	1	0.841
Hercogamia recíproca órgãos baixos			
Proporção dos morfos	0.817	1	0.367
Sistema de acasalamento	3.382	2	0.184
Grupos de polinizadores	1.099	2	0.576
Coefficiente de variação da corola	4.068	1	0.043
Gêneros	0.407	1	0.523

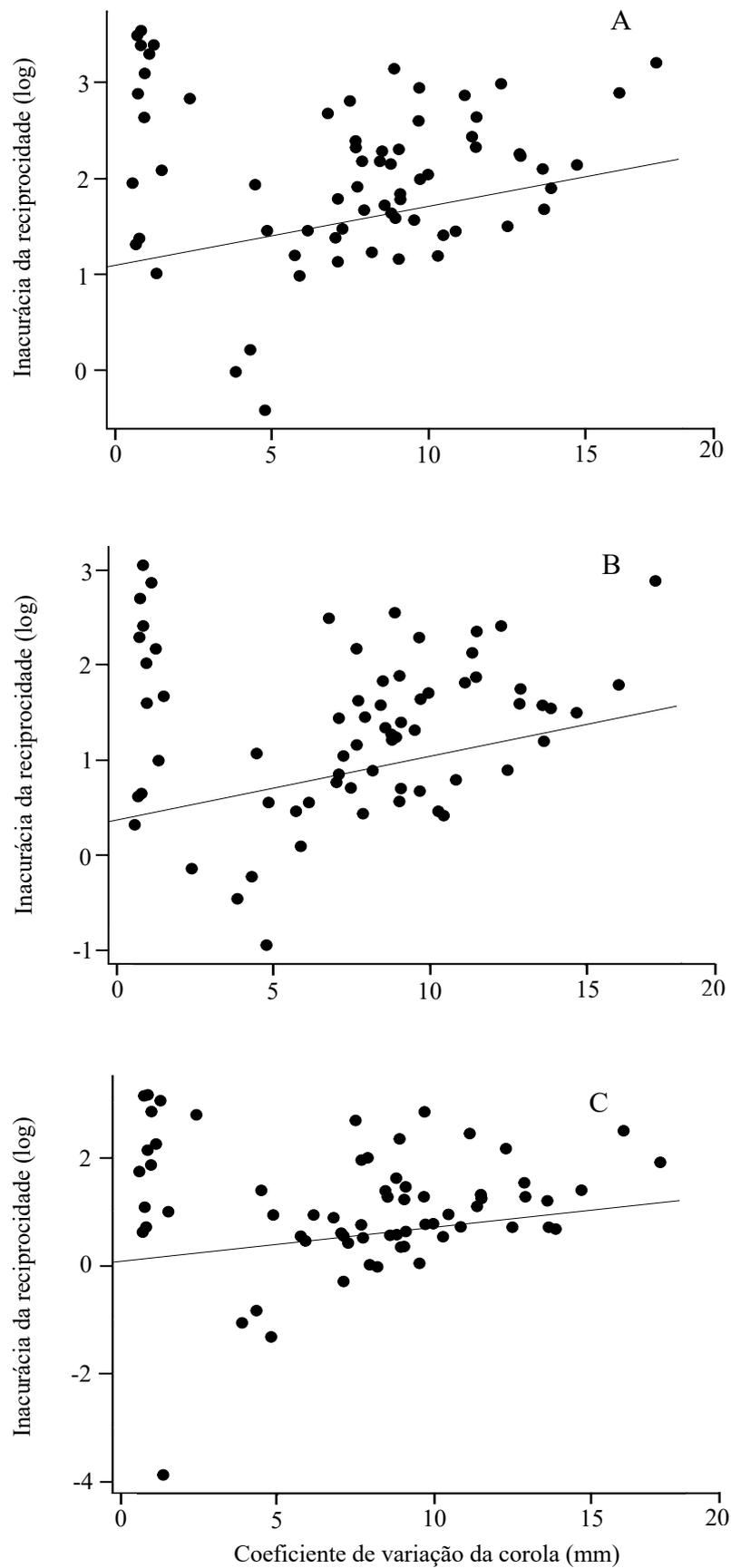


Figura 4. Relação entre o comprimento da corola e a inacurácia da reciprocidade floral das populações de *Palicourea* Aulb. e *Psychotria* L. (A) Reciprocidade total; (B) Reciprocidade dos órgãos altos; (C) Reciprocidade dos órgãos baixos.

DISCUSSÃO

Esse estudo investigou quais possíveis fatores ecológicos e morfológicos interfere nas variações da hercogamia recíproca (inacuracia total) e dos órgãos altos e baixos em espécies dos gêneros *Psychotria* e *Palicourea*. Como esperado, foi encontrado que a reciprocidade não é diferente entre os gêneros, possivelmente devido a sua proximidade filogenética, pois a distília é um caráter ancestral nesses gêneros. Por outro lado, houve diferença na reciprocidade entre os órgãos, de modo que os órgãos baixos (antras longistilas e estigmas brevistilas) foram mais recíprocos que os órgãos altos (antras brevistilas e estigmas longistilas), assim como encontrado em outros trabalhos (Armbruster et al. 2017, Jacquemyn et al. 2018, Capítulo 2). A partir desse contexto, abaixo, será considerado como diferentes cenários ecológicos e morfológicos atuam nos processos de especialização da hercogamia recíproca. Logo, vamos discutir as variações observadas com outros trabalhos que estudaram a reciprocidade em plantas distílicas, sobretudo no contexto da funcionalidade e evolução desse polimorfismo.

Vários trabalhos com espécies e populações distílicas vêm mostrando que a variação da reciprocidade entre os morfos é mais encontrada do que a reciprocidade perfeita (Faivre & McDade 2001, Valois-Cuesta et al. 2011, Brys & Jacquemyn 2015, Jacquemyn et al. 2018), e isso potencialmente pode afetar a deposição de grãos de pólen legítimos, interferindo nos padrões de reprodução das populações. Dessa forma, a hercogamia recíproca é um dos principais mecanismos que favorece a evolução e estabilidade da distília, principalmente por potencializar a transferência de pólen legítima entre os morfos (Darwin 1877, Ganders 1979, Barrett 1992). Para averiguar a reciprocidade nas populações de *Palicourea* e *Psychotria*, este estudo utilizou um método recente proposto por Armbruster et al. (2017), que se baseia na imprecisão adaptativa, com intuito de estimar a reciprocidade perfeita. Os resultados encontrados mostraram que a hercogamia recíproca entre os gêneros não foi diferente, apesar de ambos apresentarem diferenças morfológicas e tipos distintos de polinizadores (Nepokroeff et al. 1999, Razafimandimbison et al. 2014). Tais achados podem ser explicados pelo fato que os gêneros *Psychotria* e *Palicourea* estão inserido em uma mesma tribo (Psychotrieae) (Nepokroeff et al. 1999, Bremer 2009). Nesse sentido, acredita-se que a hercogamia recíproca é uma condição intrínseca ao polimorfismo, porém naturalmente esse sistema floral pode sofrer influências ecológicas pontuais. Fatores ecológicos, morfológicos e a história de vida das áreas parecem ser aspectos mais importantes nas variações da reciprocidade encontrada entre os tipos de órgãos (altos e baixos). Um estudo realizado no Panamá com as espécies desses dois gêneros corrobora essa informação, pois foi encontrado que nichos climáticos ancestrais, a estrutura e

a composição das comunidades locais estão fortemente associados com a distribuição dessas espécies nos habitats (Sedio et al. 2013), sendo plausível acreditar que esses fatores devem modular a reciprocidade em populações desses gêneros.

Os valores de inacurácia total estandardizada do presente estudo variaram, consideravelmente, em comparação aos trabalhos com *Primula* L. (Primulaceae Batsch ex. Borkh.) e *Pulmonaria* L. (Boraginaceae Juss.), pois o valor máximo de inacurácia total estandardizada encontrada neles foi de 8.8% e 20%, respectivamente (Armbruster et al. 2017, Jacquemyn et al. 2018). Em contrapartida, os resultados encontrados aqui se assemelham com os de *Erythroxyllum* P. Browne (Erythroxyllaceae), de modo que o valor máximo da inacurácia estandardizada foi de 42.94% (Matias 2018). Isso indica que a hercogamia recíproca varia entre espécies e populações, independentemente dos gêneros, reforçando que, possivelmente, traços florais influenciados pelo meio são os responsáveis por essas variações. Em todos esses trabalhos, os órgãos altos contribuíram mais para a inacurácia total do que os órgãos baixos, de forma que os órgãos baixos foram os mais recíprocos. Esses autores atribuíram tal diferença ao fato dos órgãos altos apresentarem uma maior instabilidade de desenvolvimento (órgão maior leva mais tempo para se desenvolver, estando mais exposto a variações do meio), o que resultaria em uma maior variação desses órgãos (Armbruster et al. 2017, Jacquemyn et al. 2018, Matias 2018). O presente estudo encontrou que houve efeito dos órgãos nas variações da hercogamia recíproca, de modo que a reciprocidade também foi maior nos órgãos baixos. Nas populações estudadas a maior variação dos órgãos altos (menor reciprocidade) pode representar um ganho reprodutivo, pois isso aumentaria a possibilidade de contato desses órgãos ao longo do corpo dos polinizadores, aumentando as chances de ao menos um grão de pólen ser depositado no estigma. Para esses dois gêneros, tal característica seria vantajosa, pois ambos possuem apenas dois óvulos (Delprete 2010). Dessa forma, se apenas um grão de pólen legítimo conseguir ser depositado no estigma já ocorrerá a formação do fruto, permitindo que as populações se mantenham estáveis na proporção dos morfos (1:1). Entretanto, vale ressaltar que a partir do momento em que as falhas da reciprocidade afetarem drasticamente os padrões de deposições de grãos de pólen legítimos, isto pode levar a uma quebra do polimorfismo floral distílicos, ocorrendo a perda desse sistema floral (Lloyd e Webb 1992).

Em plantas distílicas a altura das anteras e dos estigmas são influenciadas diretamente pelo comprimento da corola (Keller et al. 2012, Sá et al. 2016, Novo et al 2018). Por outro lado, a largura e comprimento da corola em ambos os morfos são afetadas pelos diferentes grupos de polinizadores (Wu et al. 2018). Esses resultados demonstram que fatores ecológicos e morfológicos são as principais explicações para as variações nos níveis de reciprocidade, uma

vez que o altura média das anteras e estigmas, e a variância desses órgãos são os principais componentes do calculo de inacurácia (reciprocidade). Alguns pesquisadores já reconheceram a importância do viés e da variância dos órgãos para se entender os níveis de reciprocidade (Eckert & Barrett 1994, Sánchez et al. 2008, 2013), contudo apenas Armbruster et al. (2017) inseriu esses componentes no seu método. Os resultados encontrados no presente estudo mostrou que os três componentes contribuíram de forma semelhante para a inacurácia dos órgãos altos, mostrando que esses órgãos foram menos recíprocos, pois a soma desses componentes foi maior que dos órgãos baixos. Para os órgãos baixos o viés maladaptativo foi o principal contribuinte para a inacurácia. Isso demonstra que mesmo o desvio do ótimo sendo maior contribuinte para a imprecisão (reciprocidade) nos órgãos baixos, isso não afetou uma menor reciprocidade desses órgãos. Isto ocorreu devida menor variância encontrada nas anteras e estigmas dos órgãos baixos, enquanto que nos órgãos altos essa variância foi maior (Fig. 3). Dessa forma os resultados relatados aqui validam o método proposto por Armbruster et al. (2017), pois mostrou que a associação entre os três componentes é realmente a melhor forma de se calcular a reciprocidade em plantas distílicas, pois mesmo uma maior desvio do ótimo não representou menor reciprocidade.

Variações encontradas no comprimento da corola entre os morfos de plantas distílicas é comum, de modo que comumente o morfo brevistilo apresenta corola com maior comprimento do que o morfo longistilo (e.g. Sobrevila et al. 1983, Richards & Koptur, 1993, Faivre & McDade 2001, Consolaro et al. 2009, Watanabe et al. 2014). Contudo, generalizações não podem ser feitas, pois alguns estudos já relataram ausência dessa diferença e outras encontraram que o maior comprimento da corola ocorreu no morfo longistilo (Castro & Araújo 2004, Lopes & Buzato 2005, Santos-Gally et al. 2015). No presente estudo, foi utilizado o coeficiente de variação da corola, é não o valor absoluto do comprimento da corola. Acredita-se que apenas diferenças nas médias do comprimento da corola podem não explicar variações nos níveis de reciprocidade, pois a funcionalidade da distília não é atribuída em valores absolutos, uma vez que as medidas de comprimento da corola, da altura dos órgãos sexuais, e do tamanho do polinizadores (corpo, bico e probóscide) oscilam entre as populações. Nesse sentido os resultados encontrados mostrou que esse fator afetou todos os níveis de hercogamia recíproca, de modo que quanto maior a variância da comprimento da corola, menor era a reciprocidade. Em contrapartida, um estudo com *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae) mostrou que o efeito do comprimento da corola na reciprocidade foi nulo, apesar dessa mesma característica afetar a altura dos órgãos reprodutivos (estames e estigma) (Novo et al. 2018). Esse resultado ocorreu

possivelmente por este trabalho não ter utilizado o coeficiente de variação da corola, pois o resultado do presente estudo mostrou que esse efeito é existente em plantas distílicas.

Um fator que pode auxiliar na explicação dos resultados encontrados neste estudo para o papel da corola na reciprocidade, é o fato dos dois gêneros apresentarem estames unidos a pétala (epipétala). Vários trabalhos que estudaram o papel dessa característica encontraram que a corola tem efeito sobre os órgãos reprodutivos (estigma e estames), sobretudo de forma mais contundente na altura dos estames, devido a essa conexão direta com a corola (Keller et al. 2012, Santos-Gally et al. 2013, Sá et al 2016, Novo et al. 2018). A característica de corolas epipétalas potencializa seu efeito na reciprocidade, pois quanto maiores os níveis de variação da altura dos órgãos (antera e estigma) menores serão os níveis de hercogamia recíproca (Armbruster et al. 2017). Assim, variações no comprimento da corola em espécies distílicas, sobretudo aquelas com estames epipétalos, demonstram que essa característica pode ser uma das principais pressões seletivas que influenciaram na evolução desse polimorfismo, uma vez que ela pode afetar a reciprocidade e conseqüentemente os padrões reprodutivos.

Em conclusão, este trabalho apresentou evidências de que a hercogamia recíproca não varia entre gêneros próximos filogeneticamente e que fatores morfológicos e ecológicos são os principais responsáveis por modular os níveis de reciprocidade em plantas distílicas de *Psychotria* e *Palicourea*. 1) Fator morfológico, de modo que as análises sobre os componentes do cálculo da inacurácia (reciprocidade), demonstrou um maior desvio do ótimo (viés maladaptativo) encontrado nos órgãos baixos não representou menor reciprocidade, uma vez que a variância de anteras e dos estigmas nesses órgãos foram baixas, contrapondo o menor desvio do ótimo. Esses resultados encontrados atestam que a soma do viés maladaptativo com a variância da altura das anteras e estigmas, é realmente uma boa métrica para se gerar informações confiáveis sobre os níveis de reciprocidade (Armbruster et al. 2017). 2) Fatores morfológicos e ecológicos, pois os resultados deste estudo possibilitou uma descoberta de que o coeficiente de variação da corola é o principal responsável por afetar os níveis de reciprocidade das populações e dos órgãos altos e baixos. E fica claro que as variações nos níveis da corola podem afetar a reciprocidade (Keller et al. 2012), sendo os polinizadores os principais responsáveis por modular as características da corola (comprimento e largura) (Wu et al. 2018). Nesse sentido, acredita-se que essas variações devam ocorrer em resposta a relação planta-polinizador de cada local específico, uma vez que os polinizadores tem um efeito indireto nos níveis de hercogamia recíproca, pois eles interferem nas características da corola. Assim, em cada população essa resposta ocorrerá de forma diferente, o que dependerá da

relação entre as flores e os polinizadores (fator ecológico), sendo que as variações resultantes dessa relação podem ser benéficas ou maléficas para a manutenção e reprodução dessas plantas.

REFERÊNCIAS

- Armbruster, W.S.; Hansen, T.F.; Pélabon, C.; Pérez-Barrales, R. & Maad, J. 2009. The adaptive accuracy of flowers: measurement and microevolutionary patterns. *Annals of Botany* 103: 1529–1545.
- Armbruster, W.S.; Bolstad, G.H.; Hansen, T.F.; Keller, B.; Conti, E. & Pélabon, C. 2017. The measure and mismeasure of reciprocity in heterostylous flowers. *New Phytologist* 215: 906–917.
- Barrett, S.C.H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: Barrett SCH, ed. *Evolution and function of heterostyly*. New York: Springer-Verlag, 1-29.
- Barrett, S.C.H. & Cruzan, M.B. 1994. Incompatibility in heterostylous plants. In: Williams, E.G.; Clarke, A.E.; Knox, R.B. eds. *Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants*. Massachusetts: Kluwer Boston, 188-219.
- Barret, S.C,H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* 3: 274-284.
- Barrett, S.C.H. & Shore, J.S. 2008. New Insights on Heterostyly: Comparative Biology, Ecology and Genetics. In: Franklin-Tong, V.E. (ed.) *Self-incompatibility in flowering plants-evolution, diversity, and mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 3-32.
- Barrett. S.C.H. & Harder, L.D. 2017. The ecology of mating and its evolutionary consequences in seed plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 48: 135-157.
- Bartoń, K. 2019. MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.43.6. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>.

- Bates, D.; Maechler, M.; Bolker, B.; Walker, S.; Christensen, R.H.B.; Singmann, H.; Dai, B.; Scheipl, F.; Grothendieck, G.; Green, P. & Fox, J. 2018. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.1-21. <https://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Bawa, K.S. & Beach, J.H. 1983. Self-Incompatibility Systems in the Rubiaceae of a Tropical Lowland Wet Forest. *American journal of botany* 70: 1281-1288.
- Bremer, B. 2009. A review of molecular phylogenetic studies of Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96: 4-26.
- Bremer, B. & Eriksson, T. 2009. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. *International Journal of Plant Sciences* 170: 766–793.
- Brys, R. & Jacquemyn, H. 2015. Disruption of the distylous syndrome in *Primula veris*. *Annals of botany* 115: 27-39.
- Castro, C.C. & Araújo, A.C. 2004. Distyly and sequential pollinators of *Psychotria nuda* (Rubiaceae) in the atlantic rain forest, Brazil. *Plant Systematic Evolution* 244: 131-139.
- Cohen, J.I. 2010. ‘A case to which no parallel exists’: the influence of Darwin’s different forms of flowers. *American Journal of Botany* 97: 701–716.
- Consolaro, H.; Toledo, R.D.P.; Ferreguti, R.L.; John, H. Oliveira, P.E. 2009. Distilia e homostilia em espécies de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) do Cerrado do Brasil Central. *Revista Brasileira de Biociências* 32: 677-689.
- Consolaro, H.; Silva, S.C.S. & Oliveira, P.E. 2011. Breakdown of distyly and pin-monomorphism in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Plant Species Biology* 26: 24-32.
- Darwin, C. 1877. *The Different Form of Flowers of the Same Species*. John Murray, London.
- Delprete, P.G. 2010. *Flora dos Estados de Goiás e Tocantins: Rubiaceae*/Piero Giuseppe Delprete: Coordenador José Ângelo Rizzo - Goiânia: PRPPG/UFG e IRD. Coleção Rizzo.
- Eckert, C.G. & Barrett, S.C.H. 1994. Tristyly, self-compatibility and floral variation in *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 53: 1–30.

- Faivre, A.E. & McDade, L.A. 2001. Population-level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of anthers and stigmas characterize heterostyly? *American Journal of Botany* 88: 841–853.
- Ferrero, V.; Castro, S.; Sánchez, J.M. & Navarro, L. 2011. Stigma–anther reciprocity, pollinators, and pollen transfer efficiency in populations of heterostylous species of *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). *Plant Systematics and Evolution* 291:267–276.
- Fisher, R.A. 1941. The theoretical consequences of polyploid inheritance for the mid style form of *Lythrum salicaria*. *Annals of Eugenics* 11: 31-38.
- Fox, J. & Weisberg, S. 2018. car: An {R} Companion to Applied Regression. 3rd ed. Thousand Oaks CA: Sage. R package version 3.0-3. <https://CRAN.R-project.org/package=car>.
- Ganders, F.R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607-635.
- Hernández, A. & Ornelas, J.F. 2007. Disassortative pollen transfer in distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a hummingbirds-pollinated shrub. *Écoscience* 14: 8-16.
- Hodgins, K.A. & Barrett, S.C.H. 2008. Asymmetrical mating patterns and the evolution of biased style-morph ratios in a tristylous daffodil. *Genetics Research* 90: 3-15.
- Horikoshi, M. & Tang, Y. 2016. ggfortify: Data Visualization Tools for Statistical Analysis Results. R package version 0.4.7. <https://CRAN.R-project.org/package=ggfortify>.
- Jacquemyn, H.; Gielen, M. & Brys, R. 2018. Is sexual organ reciprocity related to legitimate pollen deposition in distylous *Pulmonaria* (Boraginaceae)? *Oikos* 127: 1216-1224.
- Kassambara, A. & Mundt, F. 2017. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.5. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>.
- Keller, B.; De Vos, J.M. & Conti, E. 2012. Decrease of sexual organ reciprocity between heterostylous primrose species, with possible functional and evolutionary implications. *Annals of botany* 110: 1233-1244.
- Lau, P. & Bosque, C. 2003. Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae): an experimental test of the Disassortative Pollen Flow Hypothesis. *International Association for Ecology* 135:593–600.

- Lenth, R.; Singman, H.; Love, J.; Buerkner, P. & Herve, M. 2019. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>.
- Lloyd, D.G. & Webb, C.J. 1992. The evolution of heterostyly. In: Barrett SCH, ed. Evolution and function of heterostyly. Berlin: Springer-Verlag, 151-178.
- Lopes, L.E. & Buzato, S. 2005. Biologia reprodutiva de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) e a abordagem de escalas ecológicas para a fenologia de floração e frutificação. Revista Brasileira de Botânica 28: 785-795.
- Matias, R. Heterostilia e especialização sexual em espécies de *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) no cerrado do Brasil central. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Botânica, 126 p.
- Nakagawa, S.; Johnson, P.C.D. & Schielzeth, H. 2017. The coefficient of determination R^2 and intra-class correlation coefficient from generalized linear mixed-effects models revisited and expanded. Journal of the Royal Society Interface 14: 20170213.
- Nepokroeff, M.; Sytsma, K.J. & Bremer, B. 1999. Reorganization of the genus *Psychotria* and tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and rbcL sequence data. Systematic Botany 24:5–27.
- Novo, R.R.; Consolaro, H.; Almeida, N.M. & Castro, C.C. 2018. Floral biology of the velvetseed *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae): Atypical distyly or style dimorphism? Flora 239: 62-70.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>.
- Razafimandimbison, S.G.; Taylor, C.M.; Wikström, N.; Paillet, T.; Khodabandeh, A. & Bremer, B. 2014. Phylogeny and generic limits in the sister tribes Psychotrieae and Palicoureae (Rubiaceae): evolution of schizocarps in *Psychotria* and origins of bacterial leaf modules of the Malagasy species. American Journal of Botany 101: 1102–1126.
- Richards, J.H. & Koptur, S. 1993. Floral Variation and distyly in *Guettarda scraba* (Rubiaceae). American Journal of Botany 80: 31-40.

- Rodrigues, E.B. & Consolaro, H. 2013. Atypical distyly in *Psychotria goyazensis* Mull. Arg. (Rubiaceae), an intramorph self-compatible species. *Acta Botanica Brasilica* 27:155–161.
- Sá, T.; Furtado, M.T.; Ferrero, V.; Pérez-Barrales, R.; Rodrigues, E.B.; Santos, I.G. & Consolaro, H. 2016. Floral biology, reciprocal herkogamy and breeding system in four *Psychotria* species (Rubiaceae) in Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 182: 689–707.
- Sánchez, J.M.; Ferrero, V. & Navarro, L. 2008. A new approach to the quantification of degree of reciprocity in distylous (*sensu lato*) plant populations. *Annals of Botany* 102: 463-472.
- Sánchez, J.M.; Ferrero, V. & Navarro, L. 2013. Quantifying reciprocity in distylous and tristylous plant populations. *Plant Biology* 15: 616–620.
- Santos-Gally, R.; Gonzalez-Voyer, A. & Arroyo, J. 2013. Deconstructing heterostyly: The evolutionary role of incompatibility, pollinators, and floral architecture. *Evolution* 67: 2072-2082.
- Santos-Gally, R.; Castro, A.; Pérez-Barrales, R. & Arroyo, J., 2015. Styler polymorphism on the edge: unusual flower traits in Moroccan *Narcissus broussonetii* (Amaryllidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 177: 644–656.
- Sedio, B.E.; Paul, J.R.; Taylor, C.M. & Dick, C.W. 2013. Fine-scale niche structure of Neotropical forests reflects a legacy of the Great American Biotic Interchange. *Nature Communications* 4: 2317.
- Sobrevila, C.; Ramirez, N. & Enrech, N.X. 1983. Reproductive biology of *Palicourea fendleri* and *P. petiolares* (Rubiaceae): heterostylous shrubs of a tropical cloud forest in Venezuela. *Biotropica* 15: 161–169.
- Thompson, J.D. & Dommée, B. 2000. Morph-specific patterns of variation in stigma height in natural populations of distylous *Fasminum fruticans*. *New Phytologist* 148: 303–314.
- Valois-Cuesta, H.; Soriano, P.J. & Ornelas, J.F. 2011. Asymmetrical legitimate pollination in distylous *Palicourea demissa* (Rubiaceae): the role of nectar production and pollinator visitation. *Journal of Tropical Ecology* 27:393–404.

- Watanabe, K.; Shimizu, A. & Sugawara, T. 2014. Dioecy derived from distyly and pollination in *Psychotria rubra* (Rubiaceae) occurring in the Ryukyu Islands, Japan. *Plant Species Biology* 29: 181–191.
- Webb, C.J. & Lloyd, D.G. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24:163-178.
- Weller, S.G. 2009. The different forms of flowers what have we learned since Darwin? *Botanical Journal of the Linnean Society* 160: 249–261.
- Wu, Y.; Zhong, T.; Zhang, Z-Q. & Li Q-J. 2018. Pollinator-mediated selection on floral traits varies in space and between morphs in *Primula secundiflora*. *AoB PLANTS* 10: ply059.
- Zuur, A.F.; Ieno, E.N.; Walker, N.J.; Saveliev, A.A. & Smith, G.M. 2009. *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Springer, New York.

DADOS SUPLEMENTARES

Tabela S1. Estimativas da inacurácia da reciprocidade das 95 populações de *Palicourea* Aubl. e *Psychotria* L. Os valores da inacurácia dos órgãos são apresentados em mm² e em porcentagem (%) que somam 100% (coluna 2 e 3). A inacurácia total é a somatória dos valores de inacurácia dos dois tipos de órgãos dada em mm² (coluna 4) e em seu valor estandardizado % (coluna 5).

Espécies	Inacurácia alta	Inacurácia baixa	Inacurácia total (mm ²)	Média ²	Tipo do estudo	Referências
				estandardizada do total da inacurácia (%)		
<i>Palicourea coriacea</i> (Cham.)K. Schum.	11.593 (74)	4.149 (26)	15.742	13.4	Dados pessoais	UFU/Uberlândia
<i>Palicourea crocea</i> (Sw.) Roem. & Schult.	8.227 (72)	3.179 (28)	11.406	4.8	Artigo	Mendonça & Anjos 2006
<i>Palicourea crocea</i> (Sw.) Roem. & Schult.	6.302 (46)	7.462 (54)	13.763	11.7	Dados pessoais	UFG/Jatai
<i>Palicourea croceoides</i> Desv. ex Ham.	3.152 (10)	27.137 (90)	30.289	18.9	Tese	Coelho 2013
<i>Palicourea demissa</i> Standl.	6.801 (99)	0.052 (1)	6.853	2.7	Artigos	Valois-Cuesta et al. 2011a,b
<i>Palicourea fendleri</i> Standl.	2.510 (48)	2.690 (52)	5.200	3.3	Artigo	Sobrevila et al. 1983
<i>Palicourea fendleri</i> Standl.	3.290 (32)	6.900 (68)	10.190	6.3	Artigo	Sobrevila et al. 1983
<i>Palicourea longepedunculata</i> Gardner	2.320 (41)	3.308 (59)	5.628	8.6	Artigo	Pereira et al. 2006
<i>Palicourea marcgravii</i> A.St.-Hil.	14.116 (71)	5.795 (29)	19.911	7.3	Artigo	Consolaro et al. 2009
<i>Palicourea marcgravii</i> A.St.-Hil.	4.132 (40)	6.145 (60)	10.277	4.3	Dados pessoais	UFU/Uberlândia
<i>Palicourea marcgravii</i> A.St.-Hil.	4.700 (41)	6.793 (59)	11.493	4.3	Artigo	Pereira et al. 2006
<i>Palicourea officinalis</i> Mart.	5.463 (52)	5.071 (48)	10.534	9.5	Artigo	Consolaro et al. 2009
<i>Palicourea officinalis</i> Mart.	2.889 (66)	1.505 (34)	4.394	5.1	Dados pessoais	UFG/Catalão
<i>Palicourea officinalis</i> Mart.	3.890 (69)	1.786 (31)	5.676	5.9	Dados pessoais	UFG/Catalão

<i>Palicourea padifolia</i> (Roem. & Schult.) C. M. Taylor & Lorence	2.569 (18)	11.986 (82)	14.555	8.8	Artigo	Contreras & Ornelas 1998
<i>Palicourea padifolia</i> (Roem. & Schult.) C. M. Taylor & Lorence	7.874 (23)	27.058 (77)	34.932	22.0	Artigo	Hernandez & Ornelas 2007/Ornelas et al. 2004
<i>Palicourea padifolia</i> (Roem. & Schult.) C. M. Taylor & Lorence	16.963 (65)	9.037 (35)	25.999	26.9	Artigo	Hernandez & Ornelas 2007/Ornelas et al. 2004
<i>Palicourea padifolia</i> (Roem. & Schult.) C. M. Taylor & Lorence	7.464 (54)	6.287 (46)	13.751	13.9	Artigo	Hernandez & Ornelas 2007/Ornelas et al. 2004
<i>Palicourea padifolia</i> (Roem. & Schult.) C. M. Taylor & Lorence	7.327 (30)	16.852 (70)	24.179	32.7	Artigo	Hernandez & Ornelas 2007/Ornelas et al. 2004
<i>Palicourea padifolia</i> (Roem. & Schult.) C. M. Taylor & Lorence	18.512 (84)	3.625 (16)	22.137	17.8	Artigo	Hernandez & Ornelas 2007/Ornelas et al. 2004
<i>Palicourea padifolia</i> (Roem. & Schult.) C. M. Taylor & Lorence	12.283 (72)	4.856 (28)	17.139	29.5	Artigo	Hernandez & Ornelas 2007/Ornelas et al. 2004
<i>Palicourea padifolia</i> (Roem. & Schult.) C. M. Taylor & Lorence	2.940 (67)	1.479 (33)	4.419	8.0	Artigo	Hernandez & Ornelas 2007/Ornelas et al. 2004
<i>Palicourea padifolia</i> (Roem. & Schult.) C. M. Taylor & Lorence	7.327 (32)	15.226 (68)	22.552	34.4	Artigo	Hernandez & Ornelas 2007/Ornelas et al. 2004
<i>Palicourea padifolia</i> (Roem. & Schult.) C. M. Taylor & Lorence	0.398 (5)	7.313 (95)	7.711	16.9	Artigo	Hernandez & Ornelas 2007/Ornelas et al. 2004
<i>Palicourea padifolia</i> (Roem. & Schult.) C. M. Taylor & Lorence	9.719 (30)	23.085 (70)	32.804	29.6	Artigo	Hernandez & Ornelas 2007/Ornelas et al. 2004
<i>Palicourea padifolia</i> (Roem. & Schult.) C. M. Taylor & Lorence	7.827 (22)	27.478 (78)	35.306	22.3	Artigo	Hernández et al.2003
<i>Palicourea padifolia</i> (Roem. & Schult.) C. M. Taylor & Lorence	2.409 (12)	17.115 (88)	19.524	16.5	Artigo	Rec 1997
<i>Palicourea petiolaris</i> Kunth	1.810 (76)	0.570 (24)	2.380	3.1	Artigo	Sobrevila et al. 1983
<i>Palicourea petiolaris</i> Kunth	4.300 (71)	1.740 (29)	6.040	6.0	Artigo	Sobrevila et al. 1983
<i>Palicourea rigida</i> H. B. & K.	10.754 (62)	6.595 (38)	17.349	9.3	Tese	Consolaro 2008
<i>Palicourea rigida</i> H. B. & K.	3.410 (20)	13.880 (80)	17.290	7.0	Artigo	Machado et al. 2010
<i>Palicourea rigida</i> H. B. & K.	7.323 (42)	9.957 (58)	17.280	6.9	Artigo	Machado et al. 2010
<i>Palicourea rigida</i> H. B. & K.	4.660 (50)	4.660 (50)	9.270	3.7	Artigo	Machado et al. 2010
<i>Palicourea rigida</i> H. B. & K.	4.970 (68)	2.333 (32)	7.302	5.0	Dados pessoais	UFG/Catalão
<i>Palicourea rigida</i> H. B. & K.	3.377 (61)	2.133 (39)	5.510	3.5	Dados pessoais	UFG/Catalão

<i>Palicourea rigida</i> H. B. & K.	8.038 (42)	11.208 (58)	19.246	8.6	Dados pessoais	UFU/Uberlândia
<i>Palicourea tetragona</i> (Donn. Sm.)	46.435 (49)	48.859 (51)	95.294	3.9	Artigo	Martén Rodrigues et al. 2013
<i>Psychotria barbiflora</i> DC.	3.897 (83)	0.773 (17)	4.670	14.5	Artigo	Teixeira e Machado 2004
<i>Psychotria birotula</i> L.B.Sm.	0.050 (60)	0.034 (40)	0.084	0.7	Artigos	Castro et al. 2004/Castro & Oliveira 2002
<i>Psychotria brachyceras</i> Müll. Arg.	1.139 (37)	1.909 (63)	3.047	4.1	Dados pessoais	UFU/Uberlândia
<i>Psychotria brachypoda</i> (Müll. Arg.) Britton	3.559 (53)	3.185 (47)	6.744	4.1	Artigo	Fonseca et al. 2008
<i>Psychotria capitata</i> Ruiz & Pav.	2.259 (52)	2.067 (48)	4.326	4.2	Tese	Christiano 2013
<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.	0.330 (49)	0.350 (51)	0.680	3.3	Artigo	Consolaro et al. 2011
<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.	1.539 (76)	0.482 (24)	2.021	13.0	Tese	Consolaro 2008
<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.	0.556 (81)	0.128 (19)	0.685	6.1	Dissertação	Pelissaro 2012
<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.	0.789 (55)	0.648 (45)	1.437	4.5	Artigos	Faria et al. 2012/ Faria & Araújo 2016
<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.	1.684 (60)	1.139 (40)	2.823	8.1	Artigos	Faria et al. 2012/ Faria & Araújo 2016
<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.	1.364 (71)	0.566 (29)	1.930	6.6	Artigos	Faria et al. 2012/ Faria & Araújo 2016
<i>Psychotria cephalophora</i> Merr.	0.385 (41)	0.565 (59)	0.950	6.0	Artigo	Watanabe et al. 2015
<i>Psychotria chiapensis</i> Standl.	22.220 (41)	31.500 (59)	53.720	2.7	Artigo	Faivre & McDade 2001
<i>Psychotria colorata</i> (Willd. ex Schult.) Müll.Arg.	3.484 (56)	2.781 (44)	6.265	3.2	Tese	Christiano 2013
<i>Psychotria conjugens</i> Müll. Arg.	0.664 (45)	0.823 (55)	1.488	4.4	Artigo	Pereira et al. 2006
<i>Psychotria deflexa</i> DC.	2.960 (56)	2.280 (44)	5.240	19.8	Artigo	Matias et al. 2016
<i>Psychotria deflexa</i> DC.	2.413 (73)	0.899 (27)	3.311	24.6	Artigo	Sá et al. 2016
<i>Psychotria elata</i> (Sw.) Hammel	6.506 (72)	2.584 (28)	9.090	3.4	Artigo	Silva & Segura 2015
<i>Psychotria elata</i> (Sw.) Hammel	5.573 (54)	4.661 (46)	10.234	4.0	Artigo	Silva & Segura 2015
<i>Psychotria elata</i> (Sw.) Hammel	16.256 (64)	9.145 (36)	25.401	9.8	Artigo	Silva & Segura 2015
<i>Psychotria elata</i> (Sw.) Hammel	13.196 (74)	4.641 (26)	17.836	11.4	Artigo	Silva & Segura 2015

<i>Psychotria hastisepala</i> Müll. Arg.	7.910 (64)	4.448 (36)	12.358	11.1	Artigo	Pereira et al. 2006
<i>Psychotria hoffmanneggiana</i> (Willd. ex Schult.)	0.610 (53)	0.543 (47)	1.153	8.5	Dissertação	Sá 2013
<i>Psychotria hoffmanneggiana</i> (Willd. ex Schult.)	1.023 (55)	0.830 (45)	1.853	8.8	Tese	Christiano 2013
<i>Psychotria homalosperma</i> A. Gray	39.859 (40)	58.711 (60)	98.569	27.9	Artigos	Watanabe et al. 2014/ Watanabe et al. 2018
<i>Psychotria homalosperma</i> A. Gray	21.668 (33)	43.100 (67)	64.768	18.0	Artigos	Watanabe et al. 2014/ Watanabe et al. 2018
<i>Psychotria homalosperma</i> A. Gray	13.629 (46)	16.121 (54)	29.749	8.9	Artigos	Watanabe et al. 2014/ Watanabe et al. 2018
<i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes	1.260 (75)	0.410 (25)	1.670	6.7	Artigo	Rossi et al. 2005
<i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes	1.170 (69)	0.530 (31)	1.700	5.6	Artigo	Rossi et al. 2005
<i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes	1.770 (66)	0.900 (34)	2.670	10.0	Artigo	Rossi et al. 2005
<i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes	1.198 (78)	0.332 (22)	1.530	4.8	Dissertação	Silva 2006
<i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes	1.809 (72)	0.705 (28)	2.513	7.7	Dissertação	Silva 2006
<i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes	2.570 (81)	0.616 (19)	3.185	10.9	Dissertação	Silva 2006
<i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes	0.752 (62)	0.455 (38)	1.207	5.3	Dissertação	Silva 2006
<i>Psychotria jasminoides</i> (Standl.)	0.743 (65)	0.400 (35)	1.143	1.2	Artigos	Castro et al. 2004/Castro & Oliveira 2002
<i>Psychotria leiocarpa</i> Cham. & Schltdl.	0.828 (63)	0.493 (37)	1.321	3.0	Dissertação	Pelissaro 2012
<i>Psychotria leiocarpa</i> Cham. & Schltdl.	6.075 (27)	16.150 (73)	22.225	19.9	Tese	Consolaro 2008
<i>Psychotria mapouridoides</i> DC.	3.185 (63)	1.856 (37)	5.041	9.1	Tese	Consolaro 2008
<i>Psychotria mapouridoides</i> DC.	0.353 (65)	0.191 (35)	0.544	1.0	Artigos	Castro et al. 2004/Castro & Oliveira 2002
<i>Psychotria nervosa</i> Sw.	56.590 (80)	14.440 (20)	71.030	4.2	Artigo	Hernández-Ramírez 2012
<i>Psychotria nervosa</i> Sw.	88.000 (85)	14.950 (15)	102.950	6.1	Artigo	Hernández-Ramírez 2012
<i>Psychotria nitidula</i> Cham. & Schltdl.	5.386 (55)	4.320 (45)	9.706	23.1	Artigo	Sá et al. 2016
<i>Psychotria nuda</i> (Cham. e Schltdl.)	7.368 (31)	16.025 (69)	23.393	10.2	Artigo	Castro & Araújo 2004
<i>Psychotria nuda</i> (Cham. e Schltdl.)	2.168 (13)	14.593 (87)	16.761	7.0	Artigo	Pereira et al. 2006

<i>Psychotria poeppigiana</i> Müll.Arg.	9.486 (35)	17.517 (65)	27.002	17.5	Artigo	Coelho & Barbosa 2004
<i>Psychotria poeppigiana</i> Müll.Arg.	14.300 (75)	4.650 (25)	18.950	14.0	Artigo	Faivre & McDade 2001
<i>Psychotria poeppigiana</i> Müll.Arg.	3.900 (65)	2.060 (35)	5.960	4.4	Artigo	Faivre & McDade 2001
<i>Psychotria poeppigiana</i> Müll.Arg.	10.865 (77)	3.184 (23)	14.050	9.9	Dados pessoais	UFU/Uberlândia
<i>Psychotria pubigera</i> Schlttdl.	0.459 (23)	1.506 (77)	1.964	3.3	Artigos	Castro et al. 2004/Castro & Oliveira 2002
<i>Psychotria serpens</i> Linn	0.495 (72)	0.196 (28)	0.691	6.2	Artigos	Sugawara et al. 2013/ Sugawara et al. 2016
<i>Psychotria serpens</i> Linn	0.428 (60)	0.282 (40)	0.710	5.8	Artigos	Sugawara et al. 2013/ Sugawara et al. 2016
<i>Psychotria serpens</i> Linn	0.445 (59)	0.304 (41)	0.749	6.4	Artigos	Sugawara et al. 2013/ Sugawara et al. 2016
<i>Psychotria sessilis</i> Vell.	1.456 (53)	1.310 (47)	2.766	6.4	Artigo	Pereira et al. 2006
<i>Psychotria spectabilis</i> Steyrm.	9.450 (11)	77.940 (89)	87.390	14.3	Artigo	Santos et al. 2008
<i>Psychotria suterella</i> Muell. Arg.	0.355 (34)	0.685 (66)	1.040	0.5	Artigo	Lopez & Buzato 2005
<i>Psychotria tenuinervis</i> Muell. Arg.	1.688 (71)	0.680 (29)	2.367	4.9	Artigo	Virillo et al. 2007
<i>Psychotria trichophoroides</i> Müll.Arg.	3.530 (81)	0.830 (19)	4.360	5.3	Dissertação	Oliveira 2008
<i>Psychotria trichophoroides</i> Müll.Arg.	6.010 (64)	3.390 (36)	9.400	10.2	Artigo	Sá et al. 2016

CAPÍTULO 2

Do reciprocal herkogamy and pollinators affect the legitimate pollen flow in distylous species?

Short Running Title: Pollen flow in distylous Rubiaceae.

Capítulo submetido e formatado nas normas da revista
“Botanical Journal of the Linnean Society”

ABSTRACT

Distyly is a floral polymorphism where plant population presents two floral morphs with reciprocal positions of anthers and stigmas as a mechanical device to promote animal-mediated legitimate pollination. In this study we investigated the effect of reciprocity, length of stigmatic lobe and pollinators on the patterns of pollen grain deposition in distylous species. Using populations of *Palicourea* and *Psychotria*, we quantified the reciprocity and the length of the stigmatic lobe in each population. Then, we related those factors with legitimate pollen deposition in stigmas of open flowers. We also compared patterns of pollen grain deposition in populations pollinated by different groups of pollinators. We found that the level of reciprocal herkogamy and the length of the stigmatic lobe affected the deposition of legitimate pollen, where stigmas more reciprocal and with greater length of stigmatic lobe showed higher rate of legitimate pollination. The presence of more groups of pollinators have not assured a symmetric pollen flow, as in most of the populations, the legitimate pollen deposition was greater in S-morph. Our results suggest that the reciprocity is one of the main aspects responsible for the legitimate pollination, however secondary aspects, such as the length of the stigmatic lobe and pollinators, have an important impact on the deposition of legitimate pollen.

Key words: Cerrado – disassortative mating – floral polymorphism – heterostyly – inaccuracy – *Palicourea* – pollen deposition – pollination – *Psychotria* – reciprocity.

INTRODUCTION

Most angiosperms present individuals with bisexual flowers (Bawa, Perry & Beach, 1985; Barrett, 2002), which is considered an ancestral character of angiosperms (Sauquet *et al.*,

2017). This type of sexual system is thought to facilitate pollination, as it simultaneously allows the removal and deposition of pollen grains through pollinator visitation (Massinga, Johnson & Harder, 2005; Barrett & Shore, 2008). However, the presence of bisexual flowers may increase self-pollination and sexual interference between male and female functions (Barrett, 2002). Therefore, floral characteristics that potentiate cross-breeding and consequently limit the costs of self-pollination have evolved in angiosperms (Barrett, 2002). Heterostyly is a floral system that fits into such evolutionary mechanisms (Cardoso *et al.*, 2018), as it presents a morphological adjustment of floral structures to potentiate the cross pollen flow and reduce the loss of gametes, providing a biological model to investigate the real role of evolution of floral systems on the pollen flow between plants.

Heterostyly is characterized by populations that present flowers with anthers and stigma at different heights, which can be expressed in two (distyly) or three (tristyly) floral morphs in populations, with distyly being the most common (Webb & Lloyd, 1986; Barrett & Shore, 2008). The floral morphs of distyly are called S-morph (short-style) and L-morph (long-style), where the first form presents high anthers and low stigmas and the second presents high stigmas and low anthers (Darwin, 1877). The reproductive organs, specifically anthers and stigmas, of each morph are positioned at heights that correspond to the opposite morph, which is called reciprocal herkogamy (Darwin, 1877; Barrett & Cruzan, 1994; Lloyd & Webb, 1992). In addition to the morphological arrangement, this polymorphism is usually accompanied by a genetic system of heteromorphic incompatibility, in which fruits and seeds are formed after crosses between morphs (legitimate pollination; Ganders, 1979; Bawa & Beach, 1983; Barrett, 2002). The morphological and physiological mechanisms of heterostyly usually lead to a balanced frequency (isoplethy 1:1) of floral types in populations, as a result of frequency-dependent selection (Fischer, 1941; Ganders, 1979). This is because the S-morph manifests in the heterozygous form and the L-morph manifests in the recessive homozygous (Fischer, 1941).

Furthermore, the morphs of distylous species may also present differences in some characters that are described as ancillary polymorphism, such as the size and shape of the stigmas, anthers and pollen grains (Ganders, 1979; Dulberger, 1992).

Darwin (1877) was the first to propose an evolutionary hypothesis to understand why there is reciprocal positioning of anthers and stigmas between the floral morphs of distylous plants. For Darwin, reciprocal herkogamy is a mechanical device that promotes animal-mediated legitimate pollination. According to his hypothesis, the two levels of anthers allow the deposition of pollen grains on specific parts of an animal's body, which corresponds to the position where the stigma of the opposite morph contacts that same animal. In this sense, variations in the height of anthers and stigma can affect the functionality of reciprocal herkogamy and, consequently, the rates of legitimate pollination. Thus, the lower the reciprocity, the higher the costs of legitimate pollen flow and, consequently, of the reproductive fitness of each population and/or morph (Jacquemyn, Gielen & Brys, 2018). The way in which reciprocal herkogamy is numerically calculated has been the subject of major discussions, since several indices have been proposed thus far and have always been the aims of questions, due to their advantages and disadvantages (Richards & Koptur, 1993; Faivre & McDade, 2001; Lau & Bosque, 2003; Sánchez, Ferrero & Navarro, 2008, 2013). A more advantageous metric based on adaptive accuracy has been developed, which is a seemingly more coherent method, as it relates floral morphology to reproductive fitness (Armbruster *et al.*, 2009; Armbruster *et al.*, 2017).

The quantification of pollen flow in distylous populations has been used as a model in some studies to test Darwin's hypothesis (1877) (e.g. Stone, 1995; Ree, 1997; Lau & Bosque, 2003; García-Robledo, 2008; Valois-Cuesta, Soriano & Ornelas, 2011b; Deschepper, Brys & Jacquemyn, 2018), which is possible since distylous plants present pollen dimorphism among their morphs, with L-morph having smaller pollen grains than S-morph (Dulberger, 1992).

Although different experimental methods have been used, these studies have found that asymmetry in intermorph pollen flow is more frequent than symmetry, due to variations in levels of reciprocal herkogamy between morphs. However, most studies were developed in isolated populations or the data did not seek direct relationships between the variation of reciprocity with deposition of legitimate pollen. A new index that calculates reciprocity, proposed by Armbruster *et al.* (2017), verifies the degree of inaccuracy for each flower, thus relating the values of reciprocity to the deposition of legitimate pollen. To date, only two studies using *Pulmonaria* L. (Boraginaceae; Jacquemyn *et al.*, 2018) and *Primula* L. species (Primulaceae; Brys & Jacquemyn, 2019) has tested this relationship. In Rubiaceae, the family with the most distylous representatives among the 26 families with this polymorphism (109 genera in the family) (Naiki, 2012), this has not yet been tested. Morphological studies with species of this family, specifically with the genera *Psychotria* L. and *Palicourea* Aubl., have shown wide variations in the levels of reciprocal herkogamy (Hernández & Ornelas, 2007; Machado *et al.*, 2010; Valois-Cuesta, Soriano & Ornelas, 2011a; Sampson & Krebs, 2012; Matias *et al.*, 2016; Sá *et al.*, 2016), which makes the genera excellent models for investigating the relationship of reciprocal herkogamy on the pollen flow of distylous species.

Models predicting the evolution of floral polymorphisms based on the performance of pollinators use the relationship of floral traits with the removal and donation of pollen by each pollinator group as parameters (Ferrero *et al.*, 2011). These pollinators have been recognized as important selective agents in the evolution of the distylous floral system and each pollinator group can exhibit distinct selective pressures within the same plant species (Pérez-Barrales, Vargas & Arroyo, 2006). Populations of *Psychotria* and *Palicourea* have different pollinator groups, such as hummingbirds, bees, moths, butterflies, wasps and flies (Favre & McDade, 2001; Hernandez & Ornelas, 2007; Consolaro *et al.*, 2009; Consolaro, Silva & Oliveira, 2011; Faria & Araújo, 2016; Sá *et al.*, 2016; Watanabe *et al.*, 2018). Variations in the behavior and

morphology of different pollinator groups may influence their performance as efficient pollinator agents in legitimate pollen flow. It is well known that some pollinators more effectively transport pollen grains to the high organs and others to the low ones, and the presence of more pollinator groups can ensure the flow of symmetrical pollen between floral morphs, maintaining distylous patterns (Deschepper *et al.*, 2018). Thus, the richness of the pollinator guild found in the flowers of *Psychotria* and *Palicourea* makes it possible to investigate the real role of these agents in legitimate pollen flow in distylous plants.

Legitimate pollen flow can be affected by several factors, such as the variation in the height of reproductive organs (reciprocity), the size of the stigma, the diversity of pollinators, and by the behavior of visitors when they touch the reproductive organs while accessing the floral resource (Ganders, 1979; Stone, 1996; Arroyo & Barrett, 2000; Lau & Bosque, 2003). Therefore, this study analyzed whether the variations of reciprocity, the length of the stigmatic lobe and the pollinators affect the deposition of legitimate pollen grains in distylous species of *Psychotria* and *Palicourea*. Our objective was to test three hypotheses: (1) the increased deviation of floral reciprocity between compatible sexual organs has a negative effect on the amount of legitimate pollen grains deposited on the stigma; (2) the greater length of the stigmatic lobe has a positive effect on the deposition of legitimate pollen grains; (3) populations pollinated by more than one type of pollinator group have lower asymmetry in the deposition of legitimate pollen among morphs than populations visited by only one group of pollinators.

MATERIALS AND METHODS

Areas and species studied – Five populations of four species from the genera *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) were studied, in three different areas in the central region of Brazil. (1) IBGE Ecological Reserve located 35 km south of Brasília-DF (15°55'-15°58'S and 47°52'-

47°55'W); (2) a Natural Urban Area, called Pasto do Pedrinho, located in the City of Catalão-GO (18°09'-18°09'S and 47°57'-47°56'W); and (3) an Area in the Municipal Natural Park of Santa Cruz, also located in the city of Catalão-GO (18°9'36.595"S and 47°55'33.989"W). The species used were *Palicourea rigida* Kunth in areas (1) and (2): individuals up to 4 m high, considered small trees, rarely found as shrubs or subshrubs of 0.3-2 m. The flowers are zigomorphic, pentamerous, yellow to yellow-orange colored. *Palicourea officinalis* Mart. in area (1): subshrub individuals varying from 0.1-1.2 m height. Its flowers are zigomorphic, pentamerous, bright orange to red colored. *Psychotria trichophoroides* Müll. Arg in area (2): subshrub individuals with height between 0.5-1.5 m., has zigomorphic flowers, pentamerous, white or cream-colored. *Psychotria nitidula* Cham. & Schltdl. in area (3): subshrub individuals with heights between 1.0-2.5 m, has actinomorphic flowers, pentamerous, bright and white-colored. For all species, anthesis starts in the morning and ends around 17:00h, lasting for 10 to 12 hours. Data collection was carried out during the flowering of populations from October to December 2017. Vouchers of the species were deposited in the herbarium of University of Brasília (Brasília, Brazil), with the voucher numbers *Palicourea rigida* (area 1) (UB 3656), *Palicourea officinalis* (UB 172809) and in the herbarium of University Federal of Goiás (Goiânia, Brazil), with the voucher numbers *Palicourea rigida* (area 2) (47 911), *Psychotria nitidula* (43 241) and *Psychotria trichophoroides* (47 921).

Pollen dimorphism – The confirmation of pollen dimorphism, a characteristic commonly presented among the morphs of distylous species (Dulberger, 1992), was necessary to identify which morph the type of pollen found on the stigma belonged to. Usually, S-morph flowers have pollen grains with larger diameters than L-morph flowers (Lau & Bosque, 2003; García-Robledo, 2008). Therefore, pre-anthesis floral buds were collected (20 per morph, one per individual) from each population, and one anther per bud was used. Then, 10 pollen grains were

measured, totaling 200 grains per morph. Pollen diameter was measured from digital photos taken with a microscope-attached camera (microscope Bio.Labmb 210p-40p) using the ImageJ 1.45s software (Rasband, 2011; <http://imagej.nih.gov/ij/>). The student's t test was used after log (x) transforming the data to improve the distribution of the residuals. Thus, it was possible to verify dimorphism in the diameter of pollen grains between floral morphs in each population. After investigating pollen dimorphism, size classes were assigned to the pollen grains to organize them in a frequency distribution, with class intervals calculated with the Sturges formula (1926). In all populations, specific size classes were observed for each morph and classes with different overlapping levels (Fig. 1). Thus, classes presenting a less than 80% of probability of being from a specific morph were considered undetermined and were not used in the pollen grain deposition analysis.

Population reciprocity (inaccuracy) – To measure the level of reciprocity of the high and low organs in each population, the index described by Armbruster *et al.* (2017) was used, which is based on the concept of adaptive inaccuracy, in which the mean and variance of anther and stigma height of each morph are considered. This index considers that if all compatible anthers and stigmas present the same height (optimal), inaccuracy will be zero, representing perfect reciprocity. However, reciprocity is rarely perfect, and inaccuracy measures the fitness cost of the deviation of phenotypes from the optimal phenotype (Armbruster *et al.*, 2017). For this calculation, 20 flowers of each morph were collected per population, one flower per individual. The floral characteristics measured in each morph were height of the anther and stigma. The anther height was measured from the base of the filament to the middle of the anther, and the height of the stigma was measured from the base of the stylus to the middle of the stigmatic lobe (Sá *et al.*, 2016).

Reciprocity was first estimated for the organs (high and low) following the equations proposed by Armbruster *et al.* (2017), where (A) represents the average height of high anthers (S-morph), (S) the average height of high stigmas (L-morph), (a) the average height of low anthers (L-morph), and (s) the average height of low stigmas (S-morph). In this way, reciprocity (inaccuracy) was calculated for each population as:

$$\text{Inaccuracy}_{\text{high organs}} = (\bar{A} - \bar{S})^2 + V_A + V_S$$

$$\text{Inaccuracy}_{\text{low organs}} = (\bar{a} - \bar{s})^2 + V_a + V_s$$

where, V_A , V_S , V_a and V_s represent the height variance of each organ, respectively, and the letters with bars represent the mean. Subsequently, total inaccuracy (populational) was estimated based on the sum of inaccuracy of the high and low organs. To compare the total inaccuracy among populations, their values were standardized in percentage from the squared mean of all the heights of the anthers and stigmas measured for each population (Armbruster *et al.*, 2017). In this calculation, lower values of inaccuracy indicate high levels of reciprocal herkogamy (Armbruster *et al.*, 2009, 2017).

Deposition of legitimate pollen vs. floral reciprocity and length of the stigmatic lobe – In each population, 20 flowers of each morph were collected at the end of anthesis, and one flower was collected per individual. In each flower, the height of the stigma was measured and was used to quantify the deposition of legitimate pollen. Thus, it was possible to directly ascertain whether the deposition of legitimate pollen was related to the levels of floral reciprocity. The individual inaccuracy was calculated using the following equation: (individual height of the stigma – average height of compatible anthers in the population²) (Jacquemyn *et al.*, 2018). To quantify the natural deposition of legitimate pollen grains, stigmas were fixed on slides with fuchsin gel and photos of the stigmatic surface were taken using a camera coupled to an optical microscope. Subsequently, the diameter of all pollen grains deposited on the stigma were

measured to determine the origin of each grain (S-morph or L-morph) using the results of pollen dimorphism, which verified the rate of legitimate pollen deposition on each flower.

To test whether the stigma length (from the base of stigma to its apex) affects the deposition rate of legitimate pollen grains, the same 20 flowers were measured. As the stigma of the species studied are bifid and symmetrical, and in natural conditions are open, only one side of the stigmatic lobe was measured and, subsequently, the value was multiplied by two to determine the complete area of the stigmatic surface. Thus, it was possible to relate the pollen load recorded to the size of the stigmatic lobe.

Deposition of legitimate pollen vs. pollinators – Personal observations and literature (Consolaro *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2010; Sá *et al.*, 2016) already indicated that the species present different pollinator groups (e.g. hummingbirds, native and exotic bees, Lepidoptera). However, focal observations were conducted to confirm such indications, as well as to investigate the frequency of each pollinator group in the populations studied. Each population was observed for 24 hours during peak flowering, using 12 individuals of each morph. The observed individuals were chosen from the large number of open flowers during the observation period and when possible, floral visitors were collected for subsequent identification. When visitors were not collected, they were photographed for further identification. The frequency of visitors was verified through 1-hour observation sessions at each individual, and the number of visits was considered as each flower visited. The different pollinator species were classified into specific groups (hummingbirds, native and exotic bees, Lepidoptera), and the types of pollinator groups were defined in each population. In addition, the absolute frequency of visitation of each pollinator group was calculated for each population, using the sum of the frequency of each pollinating species within each group. If a given pollinator group had an absolute frequency above 90% in a population, this group would be considered the single pollinator. Thus, it was

possible to test whether the presence of more types of pollinator groups influence the deposition of legitimate pollen grains between floral morphs.

Statistical analysis – To ascertain the hypothesis that floral reciprocity, stigmatic lobe length and the number of pollinator groups affect the deposition of legitimate pollen, two generalized linear mixed-effect models (GLMMs) were performed using a binomial distribution with the logit link function. The two genera present close phylogenetic relationships (Bremer & Manen, 2000), thus, all populations were included in the analyses, which were used as random factors. For this we used the package “*lme4*” version 1.1-21 (Bates et al. 2018). In both models, the proportion of legitimate pollen grains (based on the count of legitimate and illegitimate grains) was used as a dependent variable. In the first model, the type of morph, floral reciprocity and length of the stigmatic lobe were used as independent variables (fixed factors), including the interaction between morph and floral reciprocity. For the second model, the amount of pollinator groups and morph were used as fixed factors, in which the interaction between these factors was also included. Afterwards, the Bonferroni procedure was used to correct the multiple comparisons.

After the models were performed, a likelihood ratio test was used (Anova type II) to get the P values for each of the factors and their interactions using the package “*car*” version 3.0-3 (Fox & Weisberg, 2018). When significance of factors was detected, a contrast test within and between the factors was used, using the *Lsmeans* function with Dunn's adjustment, with the package “*emmeans*” version 1.4 (Length *et al.*, 2019). In addition, the proportion of variance of each continuous significant variable was also calculated. For this, we used the package “*MuMIn*” version 1.43.6 (Bartoń, 2019), in which the marginal R^2 for the fixed factor effect alone, and the conditional R^2 for all variables included in the models (fixed and random factors)

can be calculated (Nakagawa, Johnson & Schielzeth, 2017). All analyses were performed in the R program version 3.6.0 (R Core Team, 2019).

RESULTS

Pollen dimorphism – In all populations, significant differences were found in the pollen grain diameters of the floral morphs (Table. S1). The frequency distribution of the pollen grain size showed that it was not possible to assign a specific morph to the observed pollen in only one diameter class per population (Fig. 1), therefore, it was excluded from pollen flow analyses (see details in Fig. 1). Only the *Psychotria trichophoroides* population did not present any class with probability lower than 80%, and all classes were used in the pollen flow analysis (Fig. 1D).

Population herkogamy (inaccuracy) – The total inaccuracy of populations ranged from 3.429 to 7.303 mm², so the standardized scale ranged from 3.4 to 7.5% (Table 1). The population of *Psychotria trichophoroides* population presented the lowest inaccuracy and the *Palicourea officinalis* presented the highest inaccuracy in reciprocal positioning of the sexual organs on a standardized scale (Table 1). The high organs (S-morph anthers and L-morph stigmas) were least reciprocal in all populations, and most responsible for total inaccuracy, contributing to 57 to 85% of the total inaccuracy values (Table 1).

Deposition of legitimate pollen vs. floral reciprocity and length of the stigmatic lobe – The type of morph, floral reciprocity and length of the stigmatic lobe affected the deposition of legitimate pollen on the stigma (Table 2). There was also an effect of the interaction between reciprocity and morph type, showing that the effect of reciprocity on legitimate pollen deposition was dependent on the morph (Table 2).

The general pollen load (legitimate and illegitimate) was higher in the S-morph stigma (mean of 131.46 ± 9.37 grains per stigma) than in the L-morph (mean of 93.20 ± 3.76 grains per stigma). The same pattern was found for the proportion of legitimate pollen grains, in which the S-morph (0.72 ± 0.16) received a significantly higher proportion of legitimate pollen than the L-morph (0.40 ± 0.21 ; see statistical results in Table 2). The relationship of floral reciprocity (inaccuracy) with legitimate pollen grain deposition on the stigma had a negative effect and was influenced by morph type, which was greater in the S-morph morph, thus, the stigma with greater reciprocity (less inaccuracy) had higher legitimate pollen deposition ($R^2m= 0.15$, $R^2c= 0.16$; Table 2; Fig.2). The effect was positive for stigmatic lobe length, so that larger stigmatic surfaces had higher proportions of legitimate pollen grains ($R^2m=0.04$, $R^2c=0.05$; Table 2; Fig. 3).

Deposition of legitimate pollen vs. pollinators – Populations presented different pollinator groups (Table S2, Fig. S1). The population of *Palicourea rigida* (area 1) presented three groups of visitors (hummingbirds, native bees and Lepidoptera), however, visits from native bees and Lepidoptera were rare, and hummingbirds were considered the only pollinators, since they accounted for 93.68% of the visits (Table 3). The population of this same species located in area 2 had the same pollinators groups, but the frequency of native bees and Lepidoptera was higher, and all three groups were considered potential pollinators: hummingbirds (41.3%), native bees (37.4%) and Lepidoptera (21.3%; Table 3). *Palicourea officinalis* was pollinated by native bees and hummingbirds with an absolute frequency of 77.14 and 22.86%, respectively (Table 3). *Psychotria trichophoroides* presented native bees (83.2%) and Lepidoptera (16.8%) as pollinators (Table 3). *Psychotria nitidula* was visited by exotic and native bees, and sporadically by Lepidoptera. Thus, exotic and native bees were regarded as the only pollinators of *P. nitidula*, as they showed frequencies of 83.34 and 9.33% of visits, respectively (Table 3).

The amount of pollinator groups and their interaction with the type of morph affected the deposition of legitimate pollen grains onto stigma ($X^2 = 1287.592$; $df = 4$; $p < 0.001$; $R^2_m = 0.26$, $R^2_c = 0.26$; Fig. 4). Populations pollinated by more than one pollinator group presented asymmetry in pollen flow between the morphs, in which the S-morph always received more legitimate pollen grains than the L-morph (Fig 4). In contrast, the population pollinated by a single pollinator group (hummingbirds) presented symmetry in the pollen flow between morphs, where deposition of legitimate pollen grains between the morphs was similar (Fig. 4).

DISCUSSION

Our study presented aspects that affect the deposition of legitimate pollen grains in distylous plants, revealing important points such as: (1) S-morph flowers received more legitimate pollen grains than L-morph flowers since reciprocity of low organs was greater than in the high organs. This finding is supported by the level of reciprocity affecting deposition of legitimate pollen grains, so that the more reciprocal the stigmas are, the greater the proportion of legitimate grains deposited on the stigma; (2) flowers with larger stigmatic lobes had higher deposition of legitimate pollen grains; (3) the amount of pollinator groups affect the deposition of legitimate pollen grains, in which the asymmetry of pollen flow between the morphs was registered in populations pollinated by more than one group. Our results provide support for Darwin's hypothesis about the functionality of reciprocal herkogamy, with more reciprocal organs receive more legitimate pollen grains, favoring disassortative mating. Below, we consider how the aspects of floral traits and pollinators act on the pollination processes in distylous plants. Therefore, we will discuss ecological and evolutionary aspects of the patterns that affect pollen grain deposition in distylous species.

Reciprocal herkogamy in distylous populations – Distyly has been described as a floral polymorphism characterized mainly by the reciprocal positioning between the sexual organs (high and low) of different morphs of a species (Darwin, 1877; Lloyd & Webb, 1992). Thus, it is presumed that variations in the positioning of reproductive organs (stigmas and anthers) within the same morph are as minimal as possible, so the accuracy of reciprocity is as high as possible among floral morphs. However, several studies about distylous species and populations have shown that variations in reciprocity among morphs are more common than perfect reciprocity (Faivre & McDade, 2001; Valois-Cuesta *et al.*, 2011a; Brys & Jacquemyn, 2015; Jacquemyn *et al.*, 2018), which could potentially affect the deposition of legitimate pollen grains, and interfere in populations mating patterns. The standardized inaccuracy (reciprocity) values found in the populations of *Palicourea* and *Psychotria* were similar to those of three species of *Primula* (Primulaceae) studied by Armbruster *et al.*, (2017), where inaccuracy ranged from 3.3 to 8.8%. This shows that variations in reciprocity between populations of the same genus and species are consistent. It is not known for certain what factors directly interfere in the variation of reciprocity in distylous plants, but it is possible that morphological and ecological factors, such as morph ratio, corolla length, and pollinators can be related to such variations.

The deviations of reciprocity in the populations studied were always greater in the high organs, thus mostly contributing to total inaccuracy. Studies with species of *Primula* (Primulaceae) and *Pulmonaria* (Boraginaceae) found similar results (Armbruster *et al.*, 2017; Jacquemyn *et al.*, 2018). In the respective studies, this was attributed mainly to the fact that high organs are more susceptible to variation of development, which would consequently cause lower accuracy in those organs. One characteristic that helps explain this is the fact that most heterostylous species present tubular corolla (Ganders, 1979; Lloyd & Webb, 1992). The tubular corolla determines the spectrum of floral visitors, imposing restrictions on pollinator

behavior during foraging, as it forces proboscis/beaks to follow a single path during visits. It is believed that such behavior may result in greater efficiency in the deposition of legitimate pollen between the low organs (included), as the space available for the foraging pollinator is more limited when compared to the high organs that are exposed (Lloyd & Webb, 1992; Santos-Gally, Gonzalez-Voyer & Arroyo, 2013; Costa *et al.*, 2017). Thus, the degree of insertion of sexual organs in the floral tube may also influence the patterns of disassortative pollination, and it is plausible that throughout the evolution of heterostyly, reciprocity with greater precision in the low organs was selected for better pollen flow between these organs. For the species of *Psychotria* and *Palicourea* studied here, another characteristic that should be considered is the partially epipetalous stamens with a considerable portion of the filament not fused to the corolla wall, especially in the S-morph, which could further contribute to the inaccuracy of the high organs. Especially in a tubular corolla as the species here, which gives the corolla a fundamental evolutionary role in maintaining reciprocal herkogamy, especially in species with intermorphic variation in tube size, as seen in *Palicourea officinalis* (Consolaro *et al.*, 2009) and *Palicourea rigida* (Machado *et al.*, 2010).

Functionality of reciprocity in pollen grain deposition – Darwin's hypothesis (1877) about heterostylous species, in which he mentions that reciprocal herkogamy is the main factor responsible for the deposition of legitimate pollen grains, caused several researchers to test the functionality of this hypothesis in different ways, by quantifying the flow of legitimate/illegitimate pollen and through the origin of illegitimate pollen grains (geitonogamy, self-pollination and intra-morph) (e.g. Lau & Bosque, 2003; Valois-Cuesta *et al.*, 2011b; Costa *et al.*, 2017; Deschepper *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018). Thus, the questions raised by these studies are relevant, since the variations in the levels of reciprocity associated with other floral characteristics may affect the flow of legitimate pollen, leading to a collapse of this floral

polymorphism (Faivre & McDade, 2001; Lau & Bosque, 2003; Barrett & Shore, 2008; Armbruster *et al.*, 2017). Our results support these hypotheses, since the level of floral reciprocity affected the flow of legitimate pollen in the populations of *Psychotria nitidula*, *P. trichophoroides*, *Palicourea rigida* and *P. officinalis*, showing the actual floral matching functionality, as seen in populations of *Pulmonaria* (Jacquemyn *et al.*, 2018). Thus, for distyly to be evolutionarily maintained, it is necessary that the legitimate pollination outweigh illegitimate (Lloyd & Webb, 1992), which is entirely determined by the reciprocal herkogamy of high and low organs in distylous populations.

Pollen grain deposition data revealed that the S-morph received almost twice as much legitimate pollen as the L-morph, since on average S-morph stigma received 59% legitimate pollen, while L-morph stigma received an average of 32%, possibly related to the better reciprocity of low organs in all populations studied. Other studies with distylous populations that investigated this relationship found similar results to the present study, with S-morph flowers receiving more legitimate pollen grains than L-morph ones (Lau & Bosque, 2003; Valois-Cuesta *et al.*, 2011b; Deschepper *et al.*, 2018; Jacquemyn *et al.*, 2018). Another factor, besides reciprocal herkogamy, which may explain these results is the fact that the L-morph stigma is exposed which could make it accessible to any pollen type. Although all these studies, including the present one, were carried out in natural populations and are subject to illegitimate pollination, recently conducted studies that controlled donor sources and pollen recipients from experiments with emasculated flowers also showed that L-morph flowers received less legitimate pollen grains than S-morph ones (Costa *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2018). Such similar results demonstrates that avoiding the donation of illegitimate pollen (interference of non-reciprocal organs) does not affect the deposition of legitimate pollen, thus reinforcing pollen flow is mainly modulated by the functionality of reciprocity.

We believe that reciprocal herkogamy is primarily responsible for the efficiency of legitimate pollen transfer in the heterostylous system, but other auxiliary characters may also influence this transfer, such as differences in the corolla shape, spatial distribution of the morphs, position of the anther in the corolla (spiraled or grouped), production of pollen grains and size of the stigmatic lobes (Glover & Barrett, 1986; Faivre & Mcdade, 2001). The stigmatic lobe is a factor that tends to differ between floral morphs in Rubiaceae species, as seen in the species from this study (Consolaro *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2010; Valois-Cuesta *et al.*, 2011a; Sá *et al.*, 2016). Our results showed that the stigma length has a positive effect on the deposition of legitimate pollen grains (Fig. 4). This fact may have caused the L-morph morph to receive 68% of illegitimate pollen grains, since this morph presents smaller stigmatic surfaces than the S-morph. Despite this asymmetry in the pollen flow reported in most of the populations studied, all of them presented a balanced ratio of floral morphs in their populations (Furtado, M.T. personal communication), which is largely due to these species presenting a self-incompatibility system (Consolaro *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2010; Sá *et al.*, 2016). Thus, deviations in the deposition of legitimate pollen grains between the morphs may have little impact on the patterns of disassortative mating when species have a heteromorphic incompatibility system (Zhou *et al.*, 2015). However, if pollen flow failures occur along with changes in incompatibility, this may affect patterns of mating over time and interfere in the proportion of morphs within populations and, consequently, in stability and evolutionary maintenance of distyly (Hodgins & Barrett, 2008).

Pollinator groups in pollen flow – Pollinators are considered one of the main factors associated with the evolutionary process of heterostylous floral systems (Charlesworth & Charlesworth, 1979; Barrett, 1992). This is because the anthers and stigmas of the two floral morphs deposit and collect pollen grains on specific parts of a pollinator's body, increasing the chances of

legitimate pollination and reducing interference between sexual organs within each morph (Darwin, 1877; Weller, 2009). In distylous species with tubular corollas, it is assumed that proboscis/long beak pollinators are more effective in the pollination process between morphs (Simón-Porcar, Santos-Gally & Arroyo, 2014; Costa *et al.*, 2017). However, it is known that the presence of more pollinator groups with different proboscis/beak sizes may be beneficial for distylous populations, since these visitors can complement legitimate pollen flow between the morphs (Deschepper *et al.*, 2018). The results of our study showed that the presence of more pollinator groups with distinct tongue sizes was not beneficial, since in most populations the deposition of legitimate pollen grains did not occur similarly among morphs (Fig. 4). As mentioned earlier, we believe that this was mainly due to the greater reciprocity of the low organs, however it is expected that this failure in reciprocity would be minimized by the amount of pollinators present in the populations, as this would increase the collection/deposition spectrum of pollen grains on the pollinators' body. This result was not observed, which affirms that only hummingbirds effectively transport pollen grains between two levels of organs (high and low), especially when reciprocity failures occur at some of the levels.

Hummingbirds are considered effective pollinators when there is a relationship between the morphology of their beak and the architecture of plant sexual organs (Murcia & Feinsinger, 1996). In distylous plants this pollinator group is considered efficient for depositing pollen grains in a sectioned manner on its body, however observing other aspects, such as the pattern of visitation and behavior of pollinators is important to determine the real efficacy of pollinators (Lau & Bosque, 2003; Ornelas *et al.*, 2004). In the population of *Palicourea rigida* (area 1), such relationship occurred, as hummingbirds effectively transported legitimate pollen grains symmetrically between morphs. Studies evaluating the efficiency of hummingbirds in distylous populations of *Palicourea padifolia* Humb. & Bonpl. ex Schult. and *P. demissa* Standl. found results that differed from the present study, in which these visitors were more effective in

depositing legitimate pollen grains between the low organs than the high ones (asymmetry; Ornelas *et al.*, 2004; Valois-Cuesta, Soriano & Ornelas, 2012). We believe that the symmetry found in the pollen flow among the morphs in the studied population occurred due to the sectioned deposition of the S-morph and L-morph pollen grains onto hummingbird beaks, as expected by Darwin (1877). Preliminary results achieved with a population of *Palicourea rigida* confirm this assertion, since S-morph pollen grains were deposited more frequently at the base of the beak, while L-morph grains were on the median portion of the beak (Furtado, M.T. unpublished data). Thus, a lower reciprocity can be mitigated by the sectioning of pollen grains on hummingbird beaks, so that the spectrum where grains are deposited can touch stigma at various heights (greater variation).

CONCLUSION

Overall, our results revealed that reciprocity increases the flow of legitimate pollen and that the longer the stigmatic lobe, the greater the chances of depositing legitimate pollen grains. However, contrary to our hypothesis, we found that populations pollinated by more than one pollinator group have greater asymmetry in the deposition of legitimate pollen among morphs than populations visited by only one group of pollinators. It is known that other factors may be associated with the process of pollen flow in heterostylous species, including environmental factors due to geographic variations (Hodgins & Barrett, 2008; Cunha *et al.*, 2014), the size of populations (Waites & Ågren, 2004), the distribution of floral morphs within populations (Lughadha & Parnell, 1989) and the size of each morph's floral display (Harder & Barrett, 1995). However, in the present study we concentrated efforts on factors directly linked to the functionality of reciprocal herkogamy, since this is the main factor responsible for the evolution of distyly (Lloyd & Webb, 1992; Keller, Thomson & Conti, 2014). We believe that reciprocity

is one of the main aspects responsible for reproduction in distylous populations. However, in a floral system as complex as distyly, proposing that only one or a few factors affect the maintenance and evolution of this system is a mistake. Therefore, we highlight that reciprocity plays a very important role in the maintenance of distylous plants, and we encourage further studies to be carried out to better understand the evolution of this system in the Rubiaceae family.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the people from the Reproductive Biology Lab at the Federal University of Goiás and Graduate Program of Botany at the University of Brasília for the incentive and support to develop this study. We are also grateful for Nicolay Leme da Cunha contribution to the manuscript. Funding was provided by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) to M.T. Furtado and R. Matias.

REFERENCES

- Armbruster WS, Hansen TF, Pélabon C, Pérez-Barrales R, Maad J. 2009.** The adaptive accuracy of flowers: measurement and microevolutionary patterns. *Annals of Botany* **103**: 1529-1545.
- Armbruster WS, Bolstad GH, Hansen TF, Keller B, Conti E, Pélabon C. 2017.** The measure and mismeasure of reciprocity in heterostylous flowers. *New Phytologist* **215**: 906-917.
- Arroyo J, Barrett SCH. 2000.** Discovery of distyly in *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* **87**: 748-751.

- Barrett SCH. 1992.** Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: Barrett SCH, ed. *Evolution and function of heterostyly*. New York: Springer-Verlag, 1-29.
- Barrett SCH, Cruzan MB. 1994.** Incompatibility in heterostylous plants. In: Williams EG, Clarke AE, Knox RB, eds. *Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants*. Massachusetts: Kluwer Boston, 188-219.
- Barrett SCH. 2002.** The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* **3**: 274-284.
- Barrett SCH, Shore JS. 2008.** New insights on heterostyly: comparative biology, ecology and genetics. In: Franklin-Tong VE, ed. *Self-incompatibility in flowering plants: evolution, diversity, and mechanisms*. Berlin: Springer-Verlag, 3-32.
- Bartoń K. 2019.** MuMIn: *Multi-Model Inference*. R package version 1.43.6. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S, Christensen RHB, Singmann H, Dai B, Scheipl F, Grothendieck G, Green P, Fox J. 2018.** lme4: *Linear mixed-effects models using Eigen and S4*. R package version 1.1-21. <https://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Bawa KS, Beach JH. 1983.** Self-Incompatibility Systems in the Rubiaceae of a Tropical Lowland Wet Forest. *American journal of botany* **70**: 1281-1288.
- Bawa KS, Perry DR, Beach JH. 1985.** Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees I. Sexual system and incompatibility mechanisms. *American Journal of Botany* **72**: 331-345.
- Bremer B, Manen JF. 2000.** Phylogeny and classification of the subfamily Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* **225**: 43-72.
- Brys R, Jacquemyn H. 2015.** Disruption of the distylous syndrome in *Primula veris*. *Annals of botany* **115**: 27-39.

- Brys R, Jacquemyn H. 2019.** The impact of individual inaccuracy of reciprocal herkogamy on legitimate pollen deposition and seed set in a distylous self-incompatible herb. *Journal of ecology* doi: 10.1111/1365-2745.13258.
- Cardoso JCF, Viana ML, Matias R, Furtado, MT, Caetano APDS, Consolaro H, Brito VLGD. 2018.** Towards a unified terminology for angiosperm reproductive systems. *Acta Botanica Brasilica* **32**: 329-348.
- Charlesworth D, Charlesworth B. 1979.** A model for the evolution of distyly. *American Naturalist* **114**: 467-498.
- Consolaro H, Toledo RDP, Ferreguti RL, John H, Oliveira PE. 2009.** Distilia e homostilia em espécies de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) do Cerrado do Brasil Central. *Revista Brasileira de Biociências* **32**: 677-689.
- Consolaro H, Silva SCS, Oliveira PE. 2011.** Breakdown of distyly and pin-monomorphism in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Plant Species Biology* **26**: 24-32.
- Costa J, Castro S, Loureiro J, Barrett SCH. 2017.** Experimental insights on Darwin's cross-promotion hypothesis in tristylous purple loosestrife (*Lythrum salicaria*). *American Journal of Botany* **104**: 616-626.
- Cunha NL, Fischer E, Lorenz-Lemke AP, Barrett SCH. 2014.** Floral variation and environmental heterogeneity in a tristylous clonal aquatic of the Pantanal wetlands of Brazil. *Annals of Botany* **114**: 1637-1649.
- Darwin CR. 1877.** *The different forms of flowers on plants of the same species*. London: J. Murray.
- Deschepper P, Brys R, Jacquemyn H. 2018.** The impact of flower morphology and pollinator community composition on pollen transfer in the distylous *Primula veris*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **186**: 414-424.

- Dulberger R. 1992.** Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In: Barrett SCH, ed. *Evolution and Function of Heterostyly*. Berlin: Springer-Verlag, 41-84.
- Faivre AE, McDade LA. 2001.** Population-level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of anthers and stigmas characterize heterostyly? *American Journal of Botany* **88**: 841-853.
- Faria CRR, Araujo AC. 2016.** Flowering phenology and floral visitors in distylous populations of *Psychotria carthagenensis* (Rubiaceae) in Brazilian Cerrado. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **101**: 636-647.
- Ferrero V, Castro S, Sánchez JM, Navarro L. 2011.** Stigma–anther reciprocity, pollinators, and pollen transfer efficiency in populations of heterostylous species of *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). *Plant Systematics and Evolution* **291**: 267-276.
- Fisher RA. 1941.** The theoretical consequences of polyploid inheritance for the mid style form of *Lythrum salicaria*. *Annals of Eugenics* **11**: 31-38.
- Fox J, Weisberg S. 2018.** **car**: *An {R} Companion to Applied Regression*. 3rd ed. Thousand Oaks CA: Sage. R package version 3.0-3. <https://CRAN.R-project.org/package=car>.
- Ganders FR. 1979.** The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* **17**: 607-635.
- García-Robledo C. 2008.** Asymmetry in pollen flow promotes gender specialization in morphs of the distylous neotropical herb *Arcytophyllum lavarum* (Rubiaceae). *Evolutionary Ecology* **22**: 743-755.
- Glover DE, Barrett SCH. 1986.** Stigmatic pollen loads in populations of *Pontederia cordata* from the Southern U.S. *American Journal of Botany* **73**: 1607-1612 .
- Harder LD, Barrett SCH. 1995.** Mating cost of large floral displays in hermaphrodite plants. *Nature* **373**: 512-515.

- Hernández A, Ornelas JF. 2007.** Disassortative pollen transfer in distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a hummingbirds-pollinated shrub. *Écoscience* **14**: 8-16.
- Hodgins KA, Barrett SCH. 2008.** Asymmetrical mating patterns and the evolution of biased style-morph ratios in a tristylous daffodil. *Genetics Research* **90**: 3-15.
- Jacquemyn H, Gielen M, Brys R. 2018.** Is sexual organ reciprocity related to legitimate pollen deposition in distylous *Pulmonaria* (Boraginaceae)? *Oikos* **127**: 1216-1224.
- Keller BJ, Thomson D, Conti E. 2014.** Heterostyly promotes disassortative pollination and reduces sexual interference in Darwin's primroses: Evidence from experimental studies. *Functional Ecology* **28**: 1413-1425.
- Lau P, Bosque C. 2003.** Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae): an experimental test of the Disassortative Pollen Flow Hypothesis. *International Association for Ecology* **135**: 593-600.
- Lenth R, Singman H, Love J, Buerkner P, Herve M. 2019.** emmeans: *Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means*. R package version 1.4. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>.
- Lloyd DG, Webb CJ. 1992.** The evolution of heterostyly. In: Barrett SCH, ed. *Evolution and function of heterostyly*. Berlin: Springer-Verlag, 151-178.
- Lughadha EMN, Parnell JAN. 1989.** Heterostyly and gene-flow in *Menyanthes trifoliata* L. (Menyanthaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* **100**: 337-354.
- Machado AO, Silva AP, Consolaro H, Barros MAG, Oliveira PE. 2010.** Breeding biology and distyly in *Palicourea rigida* H. B. & K. (Rubiaceae) in the Cerrados of Central Brazil. *Acta Botanica Brasilica* **24**: 686-696.
- Massinga PH, Johnson SD, Harder LD. 2005.** Heteromorphic Incompatibility and Efficiency of Pollination in Two Distylous *Pentanisia* Species (Rubiaceae). *Annals of botany* **95**: 389-399.
- Matias R, Oliveira AS, Furtado MT, Sá T, Rodrigues EB, Oliveira PE, Consolaro H. 2016.**

Sistema reprodutivo atípico de duas espécies de Rubiaceae: distilia com autoincompatibilidade parcial no morfo brevistilo? *Rodriguésia* **67**: 357-368.

Murcia C, Feinsinger P. 1996. Interspecific pollen loss by hummingbirds visiting flower mixtures: effects of floral architecture. *Ecology* **77**: 550-560.

Nakagawa S, Johnson PCD, Schielzeth H. 2017. The coefficient of determination R^2 and intra-class correlation coefficient from generalized linear mixed-effects models revisited and expanded. *Journal of the Royal Society Interface* **14**: 20170213.

Naiki A. 2012. Heterostyly and the possibility of its breakdown by polyploidization. *Plant Species Biology* **27**: 3-29.

Ornelas JF, Jiménez L, González C, Hernandez A. 2004. Reproductive ecology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in a tropical montane cloud forest. I. Hummingbirds' effectiveness as pollen vectors. *American Journal of Botany* **91**: 1052-1060.

Pérez-Barrales R, Vargas P, Arroyo J. 2006. New evidence for the Darwinian hypothesis of heterostyly: breeding systems and pollinators in *Narcissus* sect, Apodanthi. *New Phytologist*. **171**: 553-567.

R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>.

Rasband WS. 2011. *Image J, version 1.45s*. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <https://imagej.nih.gov/ij/>.

Ree RH. 1997. Pollen Flow, Fecundity, and the Adaptive Significance of Heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Biotropica* **29**: 298-308.

Richards JH, Koptur S. 1993. Floral Variation and distyly in *Guettarda scraba* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* **80**: 31-40.

Sá T, Furtado MT, Ferrero V, Pérez-Barrales R, Rodrigues EB, Santos IG, Consolaro H. 2016. Floral biology, reciprocal herkogamy and breeding system in four *Psychotria* species

(Rubiaceae) in Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* **182**: 689-707.

Sampson DA, Krebs RA. 2012. Quantitative evaluation of reciprocal herkogamy in the distylous species, *Hedyotis caerulea* (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* **298**: 1361-1370.

Sánchez JM, Ferrero V, Navarro L. 2008. A new approach to the quantification of degree of reciprocity in distylous (*sensu lato*) plant populations. *Annals of Botany* **102**: 463-472.

Sánchez JM, Ferrero V, Navarro L. 2013. Quantifying reciprocity in distylous and tristylous plant populations. *Plant Biology* **15**: 616-620.

Santos-Gally R, Gonzalez-Voyer A, Arroyo J. 2013. Deconstructing heterostyly: The evolutionary role of incompatibility, pollinators, and floral architecture. *Evolution* **67**: 2072-2082.

Sauquet H, von Balthazar M, Magallon S, Doyle J, Endress P, Bailes E, de Morais E, Bull-Hereñu K, Carrive L, Chartier M, Chomicki G, Coiro M, Cornette R, Ottra J, Epicoco C, Foster C, Jabbour F, Haevermans A, Haevermans T, Schönenberger J. 2017. The ancestral flower of angiosperms and its early diversification. *Nature Communications* **8**: 16047.

Simón-Porcar VI, Santos-Gally R, Arroyo J. 2014. Long-tongued insects promote disassortative pollen transfer in style-dimorphic *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae). *Journal of Ecology* **102**: 116–125.

Stone JL. 1995. Pollen Donation Patterns in a Tropical Distylous shrub *Psychotria suerrensis*; Rubiaceae. *American Journal of Botany* **82**: 1390-1398.

Stone JL. 1996. Components of pollination effectiveness in *Psychotria suerrensis*: a tropical distylous shrub. *Oecologia* **107**: 504-512.

Sturge HA. 1926. The choice of a class interval. *Journal of the American Statistical Association* **21**: 55-65.

Valois-Cuesta H, Soriano PJ, Ornelas JF. 2011a. Dimorphisms and self-incompatibility in

the distylous species *Palicourea demissa* (Rubiaceae): possible implications for its reproductive success. *Journal of Plant Research* **124**: 137-146.

Valois-Cuesta H, Soriano PJ, Ornelas JF. 2011b. Asymmetrical legitimate pollination in distylous *Palicourea demissa* (Rubiaceae): the role of nectar production and pollinator visitation. *Journal of Tropical Ecology* **27**: 393-404.

Valois-Cuesta H, Soriano PJ, Ornelas JF. 2012. Gender specialization in *Palicourea demissa* (Rubiaceae), a distylous, hummingbird-pollinated treelet. *Plant Systematics and Evolution* **298**: 975-984 .

Waites AR, Ågren J. 2004. Pollinator visitation, stigmatic pollen loads and among-population variation in seed set in *Lythrum salicaria*. *Journal of Ecology* **92**: 512-526.

Watanabe K, Kato H, Kuraya E, Sugawara T. 2018. Pollination and reproduction of *Psychotria homalosperma*, an endangered distylous tree endemic to the oceanic Bonin (Ogasawara) Islands, Japan. *Plant Species Biology* **33**: 16-27.

Webb CJ, Lloyd DG. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany* **24**: 163-178.

Weller SG. 2009. The different forms of flowers – what have we learned since Darwin? *Botanical Journal of the Linnean Society* **160**: 249-261.

Wu LY, Chang FF, Liu SJ, Armbruster WS, Huang SQ. 2018. Heterostyly promotes compatible pollination in buckwheats: Comparisons of intraflower, intraplant, and interplant pollen flow in distylous and homostylous *Fagopyrum*. *American Journal of Botany* **105**: 108-116.

Zhou W, Barrett SCH, Wang H, Li DZ. 2015. Reciprocal herkogamy promotes disassortative mating in a distylous species with intramorph compatibility. *New Phytologist* **206**: 1503-1512.

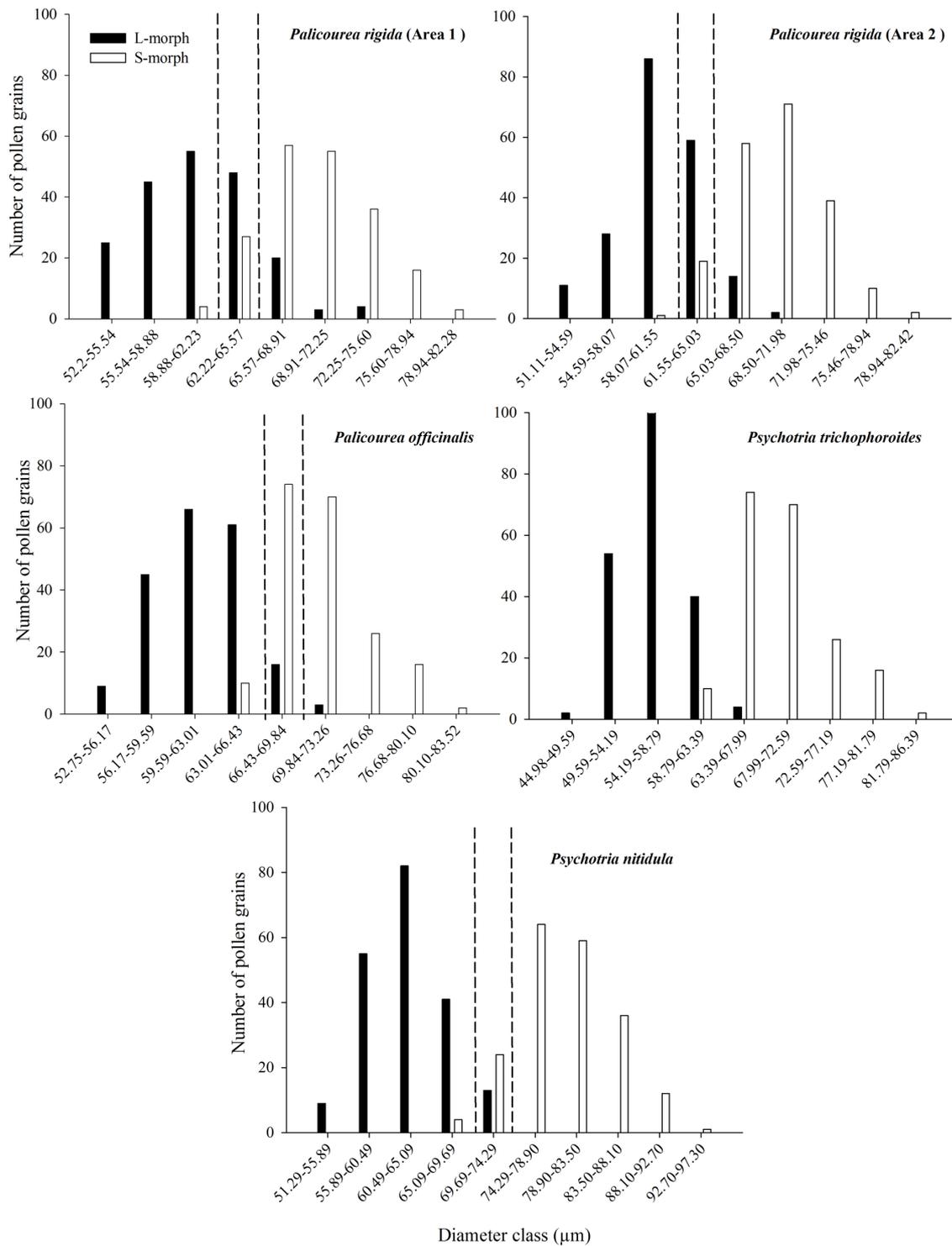


Figure 1. Frequency distribution of the number of pollen grains of L- and S-morph, according to their diameter class, of five populations of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil. Dotted lines indicate classes with more than 80% of overlapping between morphs that were excluded from the analysis the flow of pollen.

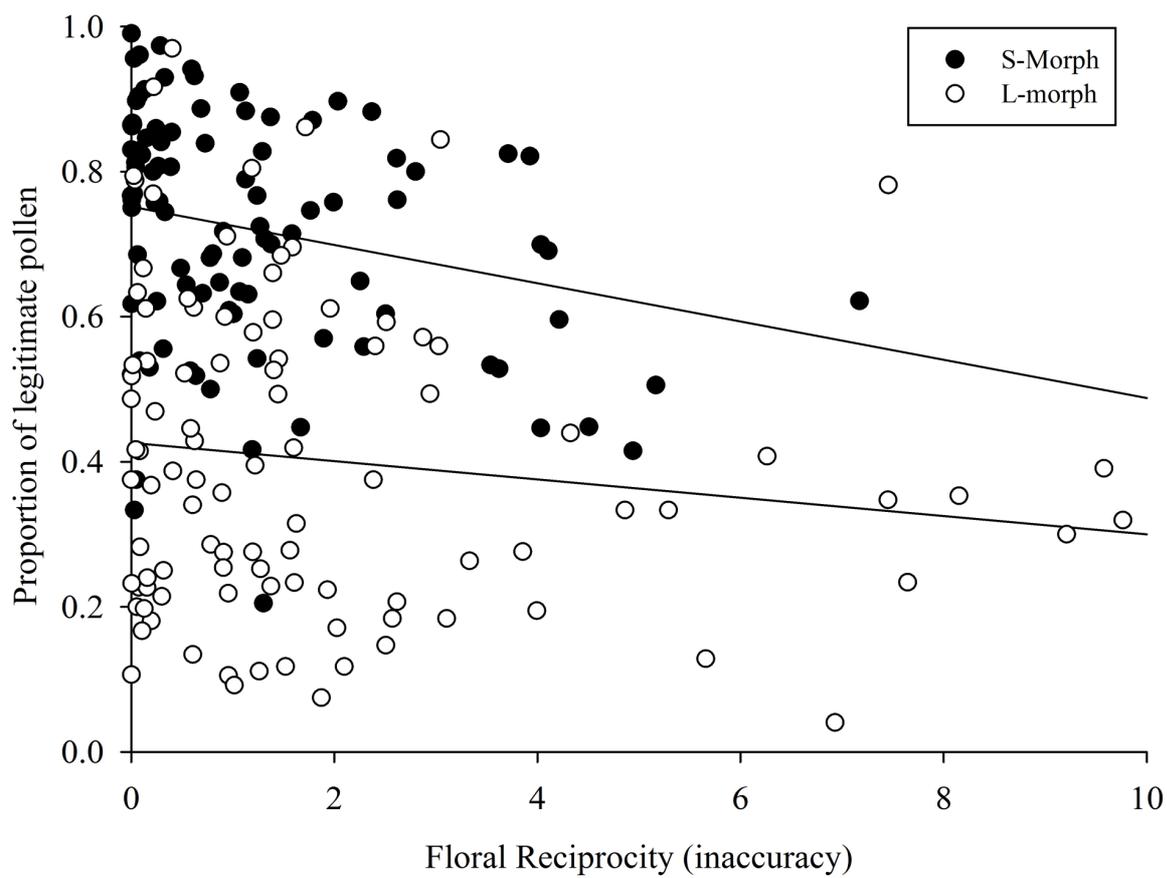


Figure 2. Relationship between the proportion of legitimate pollen deposited on stigmas and floral reciprocity in five population of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil.

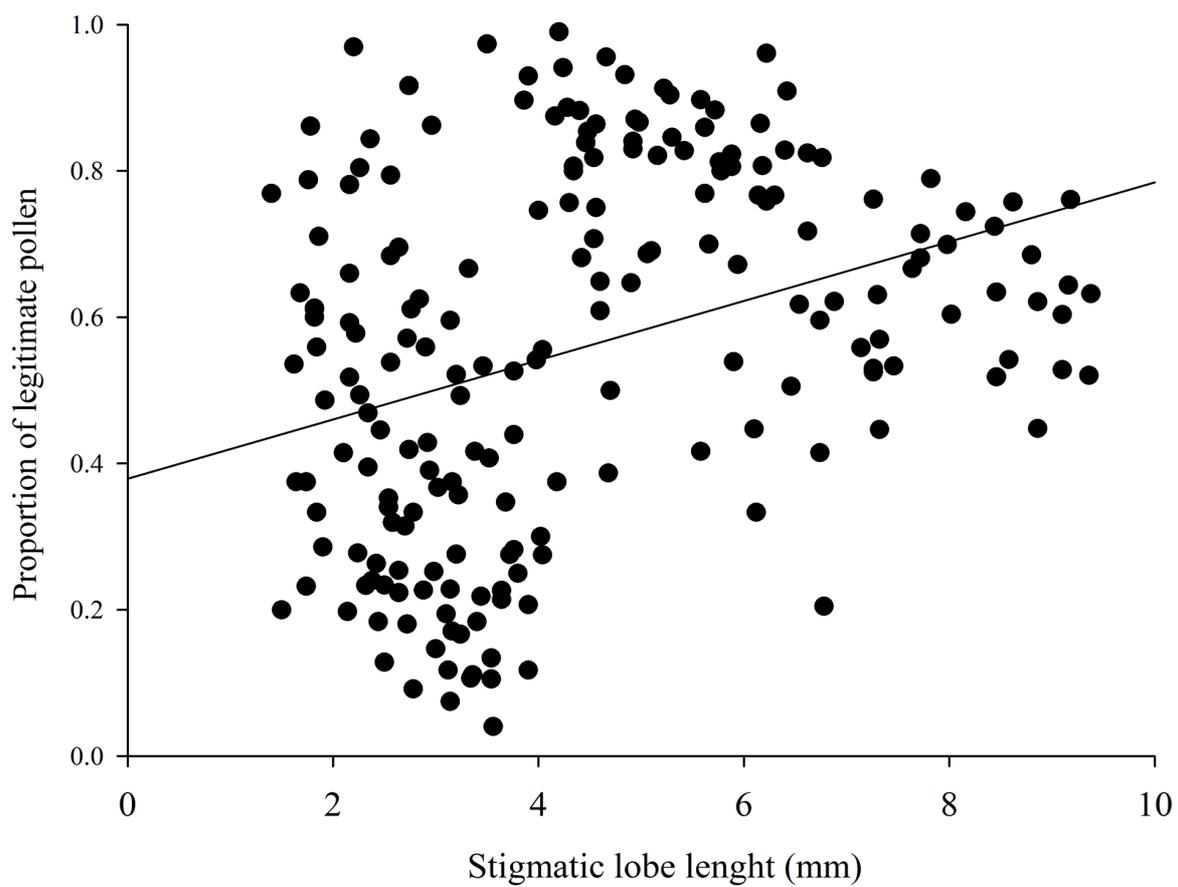


Figure 3. Relationship between the proportion of legitimate pollen deposited on stigmas and the length of stigmatic lobe in five population of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil.

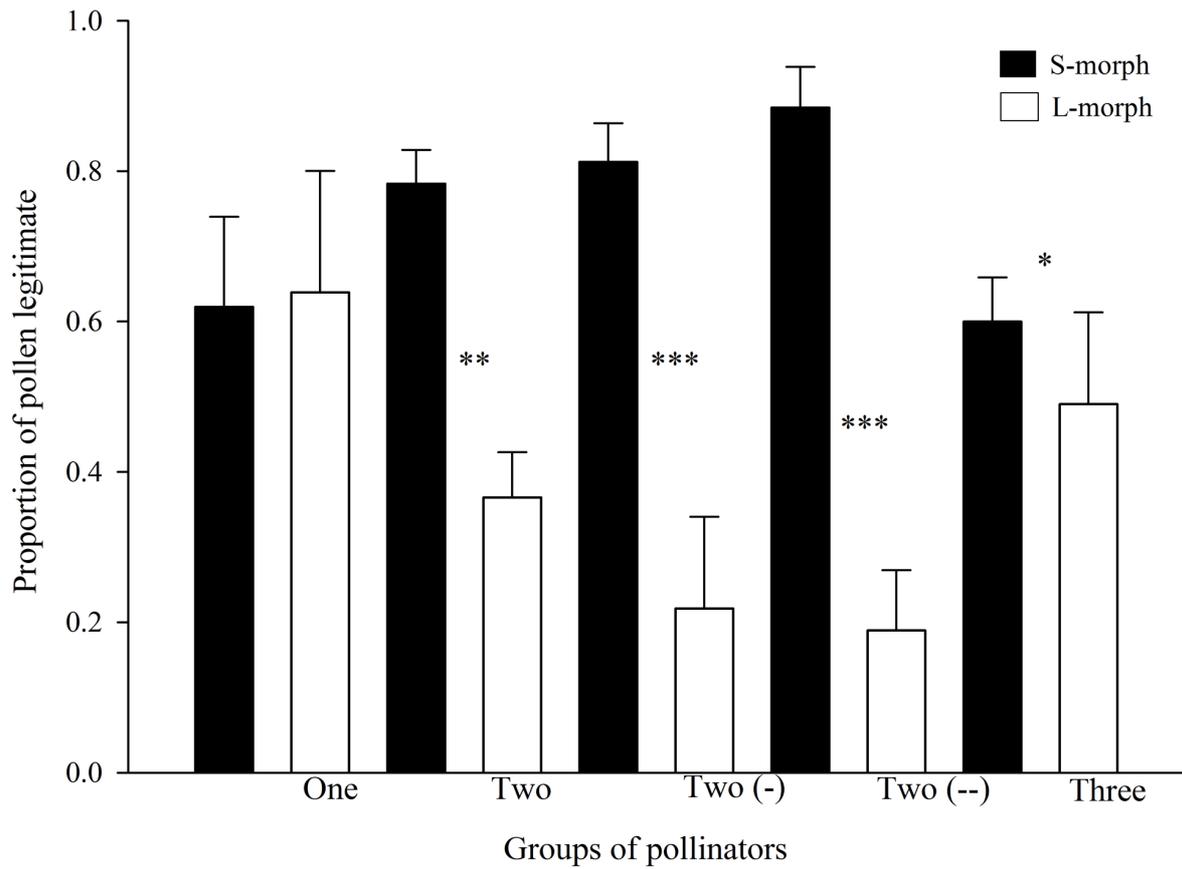


Figure 4. Proportion of legitimate pollen grains deposited on stigmas of L- and S- morphs of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) according to the number pollinator groups, in Cerrado areas of Central Brazil (mean \pm SD). Pollinator group and plant species are: One = Hummingbirds (*Palicourea rigida*, Area 1); Two = Native bees and hummingbirds (*Palicourea officinalis*); Two(-) = Native bees and Lepdoptera (*Psychotria trichophoroides*); Two(--)= Native and exotic bees (*Psychotria nitidula*); Three = Native bees and hummingbirds and Lepdoptera (*Palicourea rigida*, Area 2). Asterisk refer to statistical differences between morphs within each pollinator group (***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05).

Table 1. Height of stigmas and anthers (mm), and estimation of reciprocity (inaccuracy) of five population of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil. Values in parenthesis represent the percentage of total inaccuracy. Area 1 (*); Area 2 (**).

Species	Type of organs	Height stigmas	Height anthers	Inaccuracy (%)	Total inaccuracy	Mean ² standardized total inaccuracy (%)
<i>Palicourea rigida</i> *	High	14.56±1.55 (L-morph)	14.74±1.59 (S-morph)	4.970 (68)	7.303	5.0
	Low	9.71±1.07 (S-morph)	9.40±1.04 (L-morph)	2.333 (32)		
<i>Palicourea rigida</i> **	High	15.41±1.03 (L-morph)	15.25±1.51 (S-morph)	3.377 (61)	5.510	3.5
	Low	9.46±0.96 (S-morph)	10.01±0.96 (L-morph)	2.133 (39)		
<i>Palicourea officinalis</i>	High	12.36±1.49 (L-morph)	11.02±1.16 (S-morph)	5.066 (71)	7.121	7.5
	Low	7.60±1.13 (S-morph)	7.92±0.82 (L-morph)	2.055 (29)		
<i>Psychotria trichophoroides</i>	High	13.43±1.07 (L-morph)	13.03±1.00 (S-morph)	2.307 (57)	4.026	3.4
	Low	8.74±1.10 (S-morph)	8.35±0.61 (L-morph)	1.719 (43)		
<i>Psychotria nitidula</i>	High	9.16±0.78 (L-morph)	10.46±0.77 (S-morph)	2.903 (85)	3.429	5.6
	Low	5.74±0.49 (S-morph)	5.93±0.50 (L-morph)	0.526 (15)		

Table 2. Results of generalized linear mixed-effect models fitted to test the effect of types of morph, floral reciprocity and length of stigmatic lobe on the deposition of legitimate pollen grains on stigmas of five populations of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil.

Variable response	χ^2	df	p
Proportion of pollen grains legitimate			
Floral Reciprocity	65.541	1	<0.001
Morph	1678.802	1	<0.001
Stigmatic lobe	592.694	1	<0.001
Floral Reciprocity*Morph	27.659	1	<0.001

Table 3. Groups of pollinators and frequency of visits in five populations of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil. Bold values represent the main group of visitors of each population. Area 1 (*); Area 2 (**).

Species	Groups of pollinators / Frequency (%)			
	Natives bees	Exotics bees	Hummingbirds	Lepidoptera
<i>Palicourea rigida</i> *	1.65	0	93.68	4.67
<i>Palicourea rigida</i> **	37.4	0	41.3	21.3
<i>Palicourea officinalis</i>	77.14	0	22.86	0
<i>Psychotria trichophoroides</i>	83.2	0	0	16.8
<i>Psychotria nitidula</i>	9.33	83.34	0	7.33

SUPPLEMENTARY DATA



Figure S1. Bees and hummingbirds visiting flowers of four population of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil. **(A)** Hummingbird *Amazilia fimbriata* visiting *Palicourea rigida* (Area 2). **(B)** Hummingbird *Colibri serrirostris* visiting *Palicourea officinalis*. **(C)** Bee *Epicharis flava* visiting *Palicourea rigida* (Area 2). **(D)** Bee *Bombus* sp. visiting *Palicourea officinalis*. **(E)** Bee *Epicharis flava* visiting *Psychotria trichophoroides*. **(F)** Exotic bee *Apis mellifera* visiting *Psychotria nitidula*.

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1. Results of Student's t test of pollen grains diameter between morphs of five population of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil. Values: Mean \pm Standard Deviation. Area 1 (*); Area 2 (**).

Species	Morph		<i>t</i>	df	p
	L-morph	S-morph			
<i>Palicourea rigida</i> *	60.85 \pm 4.50 μ m	70.14 \pm 4.17 μ m	21.409	395.69	<0.001
<i>Palicourea rigida</i> **	60.52 \pm 3.26 μ m	69.58 \pm 3.64 μ m	26.235	393.16	<0.001
<i>Palicourea officinalis</i>	61.76 \pm 3.60 μ m	71.23 \pm 4.69 μ m	22.621	373.01	<0.001
<i>Psychotria trichophoroides</i>	56.24 \pm 3.22 μ m	69.83 \pm 4.91 μ m	23.158	170.79	<0.001
<i>Psychotria nitidula</i>	62.58 \pm 4.38 μ m	79.91 \pm 5.21 μ m	44.143	580.83	<0.001

SUPPLEMENTARY DATA

Table S2. Number and absolute frequency (%) of visitor species in the of five population of *Palicourea* and *Psychotria* (Rubiaceae) in Cerrado areas of Central Brazil. Area 1 (*); Area 2 (**).

Group Family Species	Number of visits / Frequency (%)				
	<i>Palicourea</i> <i>rigida</i> (*)	<i>Palicourea</i> <i>rigida</i> (**)	<i>Palicourea</i> <i>officinalis</i>	<i>Psychotria</i> <i>nitidula</i>	<i>Psychotria</i> <i>trichophoroides</i>
Bees					
Halictidae					
<i>Augochloropsis</i> sp.1	-	73 (9.48)	-	-	-
<i>Augochloropsis</i> sp.2	-	-	-	9 (0.46)	-
<i>Augochloropsis</i> sp.3	-	-	-	61 (3.13)	-
Apidea					
<i>Epicharis flava</i>	-	211 (27.40)	-	66 (3.38)	529 (51.36)
<i>Bombus</i> sp.	6 (1.65)	-	281 (70.60)	-	-
<i>Apis mellifera</i>	-	-	-	1626 (83.34)	-
<i>Eulema nigrita</i>	-	-	-	29 (1.49)	8 (0.78)
<i>Paratetrapedia flaveola</i>	-	-	-	10 (0.51)	-
<i>Partamona rustica</i>	-	-	-	7 (0.36)	-
<i>Euglossa</i> sp.	-	-	-	-	48 (4.66)
<i>Xylocopa</i> sp.	-	-	-	-	256 (24.85)
sp. 1	-	4 (0.52)	-	-	-
sp. 2	-	-	11 (2.76)	-	-
sp. 3	-	-	15 (3.77)	-	-
sp. 4	-	-	-	-	16 (1.55)
Butterflies					
Undetermined					
sp. 1	-	85 (11.04)	-	-	-
sp. 2	-	71 (9.22)	-	-	-
sp. 3	-	8 (1.04)	-	-	-
sp. 4	10 (2.75)	-	-	-	-
sp. 5	7 (1.92)	-	-	-	-
Sphingidae					
<i>Aellopos titan</i>	-	-	-	68(3.49)	105 (10.19)
sp. 1	-	-	-	75 (3.84)	-
sp. 2	-	-	-	-	39 (3.79)
sp. 3	-	-	-	-	8 (0.78)
sp. 4	-	-	-	-	21 (2.04)
Hummingbirds					
Trochilidae					
<i>Amazilia fimbriata</i>	-	255 (33.12)	-	-	-
<i>Eupetomena macroura</i>	51 (14.01)	63 (8.17)	-	-	-
<i>Colibri serrirostris</i>	290 (79.67)	-	91 (22.86)	-	-

CAPÍTULO III

**A eficácia dos beija-flores e abelhas no serviço de polinização em *Palicourea rigida*
Kunth (Rubiaceae)**

RESUMO

Plantas distílicas necessitam de visitantes florais que sejam eficientes em transportar e depositar grãos de pólen entre os morfos, pois nesse sistema a reprodução ocorre essencialmente entre indivíduos. Isso é possível devido a presença da hercogamia recíproca, que permite que os dois níveis de anteras depositem grãos de pólen em locais específicos do corpo dos polinizadores. Além disso, esses locais correspondem a altura dos estigmas do morfo correspondente, potencializando a reprodução cruzada. Entretanto, os polinizadores podem apresentar diferentes padrões de eficácia na funcionalidade desse sistema. O objetivo deste estudo foi analisar o padrão de deposição dos grãos de pólen ao longo do corpo do beija-flor e da abelha, e investigar a eficiência de cada um desses polinizadores em transferir grãos de pólen entre os estigmas e no sucesso reprodutivo de *Palicourea rigida*. A hipótese é de que os beija-flores seriam melhores polinizadores em todos os aspectos levantados. Os grãos de pólen de cada morfo foram depositados em diferentes regiões do corpo dos dois grupos de polinizadores, de modo que nas regiões proximais a maior deposição dos grãos brevistilos, enquanto nas regiões distais predominava grãos provenientes dos longistilos. Os beija-flores foram mais eficientes na transferência de pólen que as abelhas, sobretudo nos estigmas do morfo brevistilo. Contudo, essa diferença não foi reportada no sucesso reprodutivo, o que reforça a importância da abundância desses dois grupos de polinizadores no serviço de polinização desta espécie. Este trabalho revelou resultados importantes, sobre como a soma de dois grupos de polinizadores aumenta o sucesso reprodutivo de plantas distílicas. Assim, a conservação de espécies de plantas e dos polinizadores é essencial, sobretudo pela qualidade do serviço ecossistêmico prestado por esses agentes.

Palavras-chave: polinização; deposição; grãos de pólen; corpo dos polinizadores; morfos; hercogamia recíproca; sucesso reprodutivo; frutificação.

INTRODUÇÃO

As angiospermas apresentam flores com variações em tamanho, forma e sistema sexual (Proctor et al. 1996). Essas flores são polinizadas principalmente por animais (ca. 87.5% de vertebrados e invertebrados) (Ollerton et al. 2011) e cada grupo de visitante possui uma eficiência específica no serviço de polinização (Waser et al. 1996, Freitas & Sazima 2006, Ollerton et al. 2007, Dalsgaard et al. 2009). A maioria dessas flores são hermafroditas, e por

isso a autopolinização e a interferência sexual entre as funções masculinas e femininas se torna um problema, independentemente do agente polinizador (Barrett 2002). Sendo assim, as plantas evoluíram e adquiriram diferentes estratégias para reduzir a autopolinização e potencializar a reprodução cruzada (Barrett 2002). Dentre essas estratégias, tem-se o sistema floral da heterostilia, que apresenta um ajuste morfológico que separa de forma espacial os órgãos sexuais (masculino e feminino) dentro da flor (hercogamia) e um sistema fisiológico de incompatibilidade que permite apenas fecundação cruzada (Lloyd & Webb 1992, Barrett 2002).

Espécies heterostílicas são geralmente compostas por dois (distília) ou três (tristília) tipos de flores em uma mesma população, que são denominados de morfos (Ganders 1979, Webb & Lloyd 1986, Barrett & Shore 2008). Na distília, os morfos florais são referidos como longistilo, quando as anteras estão posicionadas abaixo dos estigmas, e brevistilo quando as anteras estão localizadas acima dos estigmas (Darwin 1877). Este arranjo espacial dos órgãos sexuais é conhecido como hercogamia recíproca, pois o estigma e as anteras de cada morfo estão posicionados na mesma altura do outro morfo (Lloyd & Webb 1992, Barrett & Cruzan 1994, Barrett 2002). Cada indivíduo apresenta apenas um morfo floral, sendo esperado que ocorra a frequência equilibrada (isopleτία 1:1) dos morfos nas populações (Fischer 1941, Ganders 1979). Isso é possível devido ao fato do morfo brevistilo genotipicamente se manifestar na forma heterozigota e o longistilo na forma homozigota recessiva (Fischer 1941).

A explicação evolutiva para a origem da funcionalidade da distília é a de que ela surgiu como uma forma de potencializar a reprodução cruzada e otimizar o gasto energético na produção de gametas, pois os dois níveis de anteras possibilitariam a deposição dos grãos de pólen em partes específicas do corpo dos visitantes para corresponder com a posição do estigma do morfo oposto, evitando o desperdício na produção gametofítica (Darwin 1877, Lloyd & Webb 1992). A maioria das espécies distílicas são polinizadas por mais de um grupo de polinizador (abelhas, beija-flores, mariposas etc.), sendo que a deposição polínica em partes específicas no corpo do visitante pode variar dependendo do ajuste floral vs. corporal (Keller et al. 2014, Deschepper et al. 2018), podendo afetar o transporte de pólen legítimo para os estigmas correspondentes. Dessa forma, as plantas distílicas dependem de polinizadores eficientes que sejam capazes de obter e depositar os grãos de pólen de origem cruzada em cada morfo e assim melhorar o seu sucesso reprodutivo. Estudos demonstram que os polinizadores de aparelho bucal longos são melhores em receber grãos de pólen em regiões distintas do seus corpos do que os que possuem estrutura curta (Brys et al. 2008, Keller et al. 2014, Deschepper et al. 2018). Nesse sentido, acredita-se que pelo fato dos beija-flores apresentarem aparelho bucal mais longo, isso facilitaria o recebimento de grãos de pólen em regiões distintas do seus corpos.

Estimativa para avaliar a eficácia de diferentes grupos de polinizadores nas plantas é medida com base no resultado de uma única visita (Gross 2005, Freitas 2013). As aves (p. ex., beija-flores) e os insetos (inclusive abelhas) apresentam diferenças nos padrões de fluxo e transferência de pólen, bem como no deslocamento no espaço e o comportamento durante as visitas (Krauss et al. 2017, Lehmann et al. 2019). Essa diferenças dificultam a estimativa da eficiência dos polinizadores, onde uma gama de componentes florais e comportamentais estão envolvidos nessa relação planta-polinizador (Faria & Araújo 2015, Ballantyne et al. 2015, Deschepper et al. 2018, Lehmann et al. 2019). Em espécies distílicas, um componente seguro e eficiente é a deposição de pólen no estigma, pois a maioria delas, tais como as espécies do gênero *Palicourea*, apresenta dimorfismo polínico entre morfos (Dulberger 1992). Esses dois grupos de polinizadores já foram relatados como visitantes em espécies do gênero *Palicourea* Aubl. (Hernández & Ornelas 2007, Consolaro et al. 2009, Machado et al. 2010). E em espécies distílicas da savana neotropical, a relação de eficiência na polinização entre beija-flores e abelhas ainda não foi investigada, sobretudo no que diz respeito a deposição de grãos de pólen de cada morfo em partes específicas do corpo dos polinizadores, assim como previsto por Darwin (1877).

Investigar o papel de diferentes polinizadores é essencial, sobretudo em um sistema floral complexo que depende desses agentes para a sua reprodução. Além disso fornecer conhecimento sobre polinizadores é muito importante, pois esses agentes são responsáveis por prestações de serviços ecossistêmicos de qualidade, sobretudo em ações mutualísticas com as plantas. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia no serviço de polinização de beija-flores e abelhas em uma população distílica de *Palicourea rigida* Kunth (Rubiaceae). A partir desse objetivo, foram levantadas três hipóteses: 1) A deposição de grãos de pólen de cada morfo ocorre de forma compartimentada no corpo dos polinizadores (bico e probóscide), assim como previsto por Darwin (1877); 2) Os beija-flores são mais eficientes que as abelhas em depositar grãos de pólen legítimos sobre os estigmas de ambos os morfos após uma única visita; 3) O serviço de polinização dos beija-flores é mais eficiente do que o das abelhas em relação a produção de frutos após uma única visita entre e dentre os morfos. Espera-se que o serviço de polinização dos beija-flores seja mais eficiente do que o das abelhas após uma única visita entre e dentre os morfos. Pois, os beija-flores apresentam aparelho bucal mais longo e um comportamento de menos limpeza corpórea que as abelhas, o que facilitaria o recebimento e a permanência de grãos de pólen em regiões distintas do seus corpos, possibilitando uma melhor polinização.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas e espécie estudada – A população utilizada foi a de *Palicourea rigida* que se encontra em uma área urbana da cidade de Catalão-Goiás denominada de Pasto do Pedrinho, de fitofisionomia predominante cerrado (sentido restrito) (18°09'-18°09'S e 47°57'-47°56'W). Na população selecionada foram encontrados os dois morfos em isoplelia e altas taxas de visitas de beija-flores e abelhas (Capítulo 2), o que possibilitou investigar as hipóteses levantadas nos objetivos. *Palicourea* (Rubiaceae) possui aproximadamente 200 espécies, sendo a distília uma característica ancestral no gênero (Taylor 1997). Os indivíduos da espécie tem porte arbóreo de até 4 m de altura, sendo raramente encontrados como arbustos ou subarbustos de 0.3-2m. As flores são pediceladas com cálice cupular, pentâmero e alaranjado ou avermelho. A corola é tubular, gamopétala, actinomorfas, pentâmera de amarelo a amarelo-alaranjado.

Deposição de pólen no corpo dos polinizadores – A segregação dos grãos de pólen no corpo dos polinizadores foi averiguada por meio de testes simulatórios de visitas de beija-flores e abelhas. Para a realização do procedimento experimental, foram coletados ramos com inflorescências contendo botões florais em pré-antese. Posteriormente, estes ramos foram transportados ao laboratório e inseridos em frascos contendo água destilada. No dia seguinte após o início da antese, as simulações de visitas foram realizadas. Para o beija-flor, foi utilizado um espécime taxidermizado de *Thalurania glaucopis* Gmelin 1788 com comprimento do bico de 18.3mm, exemplar fornecido pela Coleção Zoológica da Universidade de Brasília (UnB). Apesar dessa espécie de beija-flor não ser visitante de *P. rigida*, as características físicas do bico, como tamanho e curvatura (aparelho bucal), são muito semelhantes ao de outras espécies que são consideradas polinizadoras (Capítulo 2). O bico da ave foi dividido em três partes iguais (base, meio e ponta), cada uma medindo 6.1mm, de modo que foi possível averiguar de forma compartimentada a deposição de grãos de pólen dos morfos ao longo do bico. Para as abelhas, a espécie utilizada foi *Epicharis flava* Friese 1900, um dos principais visitantes da população estudada (Capítulo 2). Durante o experimento, um espécime desta abelha foi coletada em campo e, posteriormente, sacrificado com a proboscíde estendida. Nesse grupo de polinizador foi considerado apenas proboscíde (13.26mm, aparelho bucal) e cabeça (14.02mm), pois são as partes que contatam os verticilos reprodutivos (obs. pess.). Para se ter uma ideia do grau de inserção do bico/proboscíde no tubo da corola, foram realizadas observações do comportamento de visita de ambos os visitantes *in loco*, juntamente com registros fotográficos e de filmagens (filmadora Sony Handycam HDR-CX 405). Para cada grupo de polinizador, foram realizadas

32 simulações de visitas, de modo que estas foram efetuadas colocando o bico ou a proboscíde nas flores do morfo brevistilo e, posteriormente, no morfo longistilo (n=16) e vice-versa (n=16). Em cada simulação, flores intactas foram utilizadas e cada uma das partes do bico (base, meio e ponta) e do corpo das abelhas (proboscíde e cabeça) foram limpas com auxílio de um pincel sobre uma lâmina. Posteriormente, foi adicionado gel de fucsina sobre a lâmina a fim de corar os grãos de pólen. Dessa forma, foi possível identificar e contabilizar em cada parte do corpo dos polinizadores a quantidade de grãos de pólen por morfo, uma vez que *P. rigida* apresenta dimorfismo polínico entre os tipos florais (Capítulo 2).

Fluxo de pólen legítimo e ilegítimo – Para analisar a eficácia dos beija-flores e das abelhas na transferência de pólen legítimo e ilegítimo, foram utilizados os mesmos espécimes citados no tópico anterior. Foram realizados testes de uma única visita a partir de testes simulatórios utilizando-se os dois grupos de polinizadores. Em laboratório, as flores utilizadas como receptoras foram emasculadas a fim de evitar a auto interferência e as flores doadoras foram deixadas intactas. Para testar esse efeito, foram feitas quatro diferentes sequências (Tab. 1).

Para cada sequência, foram utilizadas 15 flores doadoras e 15 receptoras para cada grupo de polinizador (beija-flor e abelha), totalizando 30 flores para cada sequência. As visitas manuais foram realizadas do mesmo modo descrito no tópico anterior, sempre obedecendo a sequência realizada, sendo o primeiro o doador e segundo o receptor. Sempre após cada sequência realizada, o corpo dos espécimes foram limpos antes do prosseguimento dos experimentos. Após a realização das visitas, os estigmas das flores receptoras foram coletados e contabilizada a quantidade de grãos de pólen. Dessa forma, foi possível comparar qual polinizador foi mais eficaz na transferência de pólen ilegítimo e legítimo em cada morfo floral.

Tabela 1. Sequências utilizadas para testar o efeito dos beija-flores e das abelhas no fluxo de pólen legítimo e ilegítimo em *Palicourea rigida* Kunth. (Rubiaceae).

Sequência	Doador		Receptor		Tipo de pólen
1	Longistilo (15)	➡	Longistilo (15)	➡	Ilegítimo
2	Longistilo (15)	➡	Brevistilo (15)	➡	Legítimo
3	Brevistilo (15)	➡	Brevistilo (15)	➡	Ilegítimo
4	Brevistilo (15)	➡	Longistilo (15)	➡	Legítimo

Eficácia dos polinizadores na produção de frutos – A produção de frutos após uma única visita dos beija-flores e abelhas foi testada em campo com visitantes naturais em 10 indivíduos de cada morfo, de modo que todas as inflorescências em cada indivíduo foram ensacadas no dia

anterior a abertura das flores. Esse procedimento foi necessário para evitar o contato das flores com possíveis polinizadores naturais antes do experimento. Além disso, imediatamente após a sua abertura, todas as flores foram emasculadas para evitar o contato do estigma com os próprios grãos de pólen. Após todos esses procedimentos, as flores foram expostas aos visitantes, de forma que as flores visitadas uma única vez foram marcadas com linhas de nylon de cores diferentes no seu pedicelo e a inflorescência novamente ensacada para evitar o contato com outros polinizadores. Cada tipo de polinizador visitou uma única vez de quatro a oito flores, dependendo da disponibilidade de flores abertas por indivíduo. Um tratamento controle (beija-flor e abelhas) também foi realizado, de modo que em 10 indivíduos foram marcadas cinco flores por indivíduo de forma aleatória e deixadas expostas a esses visitantes ao longo de todo o dia. Após 40 dias, foi realizado um senso a fim de contabilizar a eficácia de tipo de polinizador/tratamento (beija-flores, abelhas e controle) na produção de frutos formados em cada morfo floral. Os polinizadores observados visitando as flores foram os beija-flores *Amazilia fimbriata* e *Eupetomena macroura* e a abelha *Epicharis flava*, que são os principais visitantes (Capítulo 2, Fig. 1).

Análises estatísticas – Para analisar as hipóteses levantadas nos objetivos foram realizados modelos lineares generalizados de efeitos mistos (GLMMs). A deposição de grãos de pólen nas partes específicas do corpo dos polinizadores foi testada a partir de dois modelos, um para cada grupo de polinizador (beija-flor e abelha). Em ambos os modelos, a quantidade de grãos de pólen foi utilizada como variável dependente, sendo as partes dos corpos dos polinizadores, o tipo de pólen e suas interações tratados como variáveis independentes (fatores fixos). Nestes modelos, a sequência das visitas foi utilizada como fator aleatório. Para analisar se o fluxo de pólen legítimo e ilegítimo após uma única visita foi diferente entre os polinizadores e entre os morfos, foram realizados também dois modelos, um para cada tipo de pólen (legítimo e ilegítimo), de modo que o tipo de polinizador, os morfos e suas interações foram utilizadas como variáveis independentes (fatores fixos), sendo a sequência tratada como um fator aleatório. Nestes modelos, foram usados uma distribuição de Poisson com a função link log.

Para testar a eficácia dos polinizadores na produção de frutos foi utilizada a proporção de frutos formados (com base na contagem de frutos por flores visitadas) como variável dependente, e os tipo de visitas (beija-flor, abelha e controle), os morfos florais e suas interações como variáveis independentes (fatores fixos), sendo os indivíduos tratados como um fator aleatório. Neste modelo, foi utilizado uma distribuição binomial com a função link logit. Para a realização de todos modelos foi utilizado o pacote “*lme4*” versão 1.1-21 (Bates *et al.* 2018).

Posteriormente, foi utilizado um teste de razão de verossimilhança (Anova tipo II) ($p \geq 0.05$) para cada um dos fatores e suas interações usando o pacote “car” versão 3.0-3 (Fox & Weisberg 2018). Quando a significância dos fatores foi detectada, foi utilizado um teste de contraste dentro e entre os fatores, através da função *lsmeans* com ajuste de Dunn usando o pacote “emmeans” versão 1.4 (Lenth et al. 2019). Todas as análises foram realizadas no programa R versão 3.6.0 (R Core Team 2019).

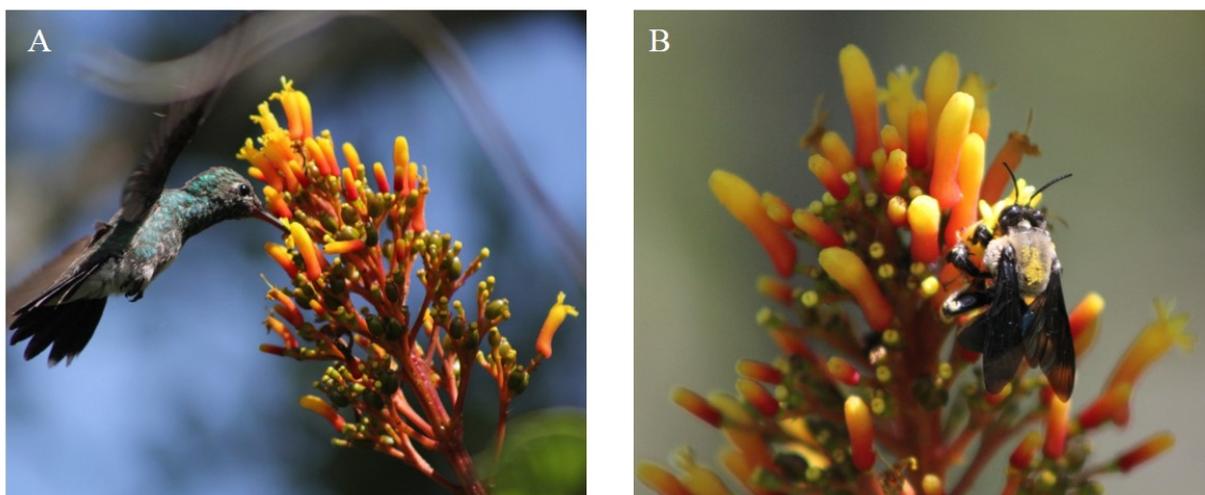


Figura 1. Polinizadores visitando as flores de *Palicourea rigida* Kunth. (Rubiaceae). (A) Beija-flor *Amazilia fimbriata* e flor do morfo longistilo. (B) Abelha *Epicharis flava* e flor do morfo brevistilo.

RESULTADOS

Deposição de pólen no corpo dos polinizadores – Foi encontrado que a deposição de pólen ocorre de modo setorizado no corpo dos polinizadores, tanto do beija-flor quanto da abelha. As partes dos corpos dos polinizadores e sua interação com o tipo de pólen tiveram efeito na quantidade de grãos de pólen depositados no corpo do beija-flor e da abelha (Tab. 2). Para o beija-flor, a quantidade de grãos de pólen do morfo brevistilo foi maior em todas as partes do bico em comparação com a do morfo longistilo (Fig. 2A). Quando analisada apenas a quantidade de grãos do morfo brevistilo, nota-se que a maior parte desses grãos estavam presentes na base do bico do beija-flor em comparação com o meio e a ponta que apresentaram quantidades semelhantes de grãos (Fig. 2A). Os grãos do morfo longistilo estiveram presentes em maiores quantidades no meio do bico, posteriormente na ponta e em pouquíssimas quantidades na base (Fig. 2A). Na abelha, quando comparado aos tipos de pólen na mesma

região do corpo, foi encontrado que na cabeça a quantidade de grãos de pólen brevistilo foi maior que a do longistilo, sendo o contrário encontrado na proboscíde, com longistilo apresentando mais grãos que o brevistilo (Fig. 2B). Quando analisada apenas a quantidade de grãos de pólen brevistilo entre as regiões do corpo da abelha, nota-se que foram depositados mais grãos na cabeça do que na proboscíde, sendo o contrário encontrado para grãos de pólen longistilo, no qual a proboscíde possuía mais grãos do que a cabeça (Fig. 2B).

Tabela 2. Resultados dos diferentes modelos lineares generalizados realizados para testar distintos efeitos: a deposição de grãos de pólen nas partes específicas do corpo dos polinizadores; a deposição de grãos de pólen legítimo e ilegítimo após a visita dos diferentes grupos de polinizadores; a produção de frutos após única visita de abelha e beija-flores em *Palicourea rigida* Kunth. (Rubiaceae).

Variáveis	χ^2	df	p
Grãos de pólen no beija-flor			
Tipo de pólen	1263.332	1	<0.001
Partes do corpo	49.717	2	<0.001
Tipo de pólen*Partes do corpo	517.441	2	<0.001
Grãos de pólen na abelha			
Tipo de pólen	65.343	1	<0.001
Partes do corpo	77.318	1	<0.001
Tipo de pólen*Partes do corpo	1102.491	1	<0.001
Grãos de pólen legítimo			
Tipo de polinizador	42.428	1	<0.001
Morfo	0.760	1	0.383
Tipo de polinizador*Morfo	490.143	1	<0.001
Grãos de pólen ilegítimo			
Tipo de polinizador	70.044	1	<0.001
Morfo	84.233	1	<0.001
Tipo de polinizador*Morfo	22.447	1	<0.001
Proporção de frutos			
Tipo de visitas	14.475	2	<0.001
Morfo	5.530	1	0.018
Tipo de visitas*Morfo	7.877	2	0.019

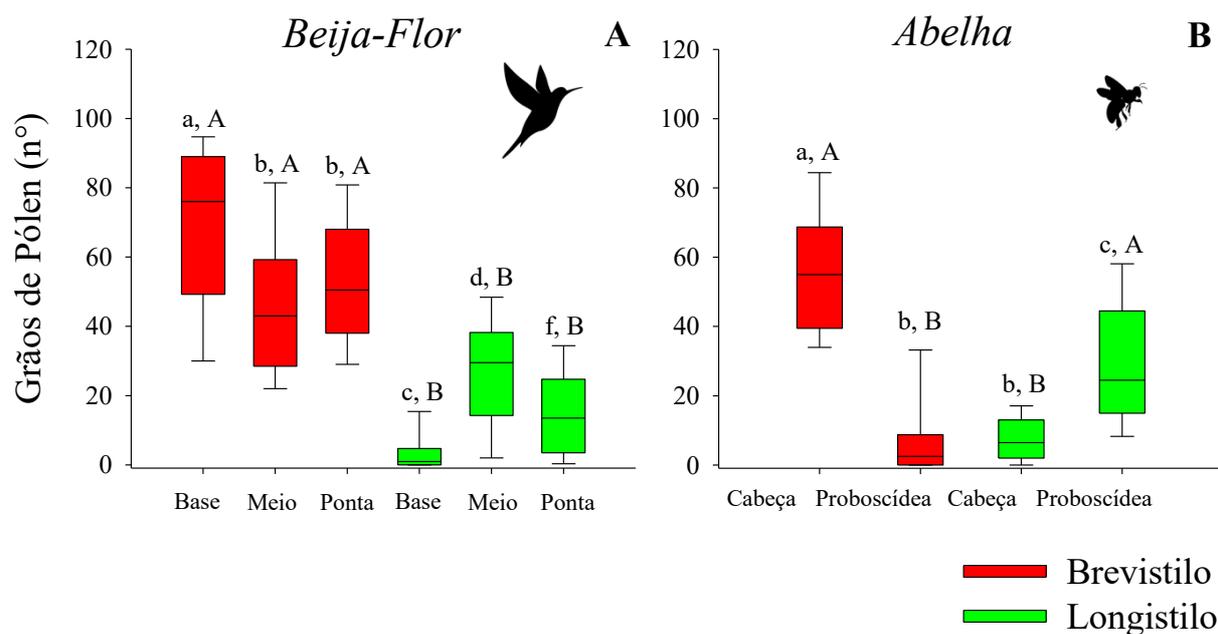


Figura 2. Número de grãos de pólen dos morfos brevistilo e longistilo depositados no bico do beija-flor (A) e no corpo da abelha (B) em *Palicourea rigida* Kunth. (Rubiaceae). Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas ($p < 0.001$) dentro de um morfo. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as partes correspondentes do corpo ou do bico dos polinizadores entre dois morfos.

Fluxo de pólen legítimo e ilegítimo – Foi encontrado que um tipo de polinizador é mais eficaz em depositar grãos de pólen legítimo em um tipo específico de morfo do que em outro, pois os resultados do modelo para o experimento com pólen legítimo mostraram que houve uma interação entre o tipo de polinizador e os morfos (Tab. 2). Nesse caso, os beija-flores foram mais eficazes em depositar grãos de pólen legítimo no estigma do morfo brevistilo em comparação as abelhas (Fig. 3A). Enquanto para o longistilo, tanto as abelhas quanto os beija-flores depositaram quantidades semelhantes de grãos de pólen legítimo sobre o estigma (Fig. 3A). A comparação dentro de cada grupo específico de polinizador mostrou que os beija-flores depositaram mais grãos de pólen legítimos no estigma do morfo brevistilo em comparação ao do morfo longistilo (Fig. 3A), enquanto as abelhas foram mais eficazes em depositar grãos de pólen sobre o estigma do morfo longistilo em comparação ao brevistilo (Fig. 3A).

O modelo para a quantidade de grãos de pólen ilegítimo, mostrou que houve efeito da interação entre o tipo de polinizador e os morfos (Tab. 2). Para este resultado, os beija-flores depositaram maiores quantidades de grãos de pólen ilegítimo nos estigmas do morfo brevistilo em relação as abelhas (Fig. 3B), enquanto nos estigmas do morfo longistilo os dois grupos de polinizadores depositaram quantidades semelhantes de grãos de pólen ilegítimos (Fig. 3B). Os

beija-flores transportaram mais grãos de pólen ilegítimo para os estigmas do morfo brevistilo em comparação com o longistilo (Fig. 3B). Para as abelhas não houve diferença na quantidade de grãos de pólen ilegítimos nos estigmas do morfo brevistilo e longistilo (Fig. 3B).

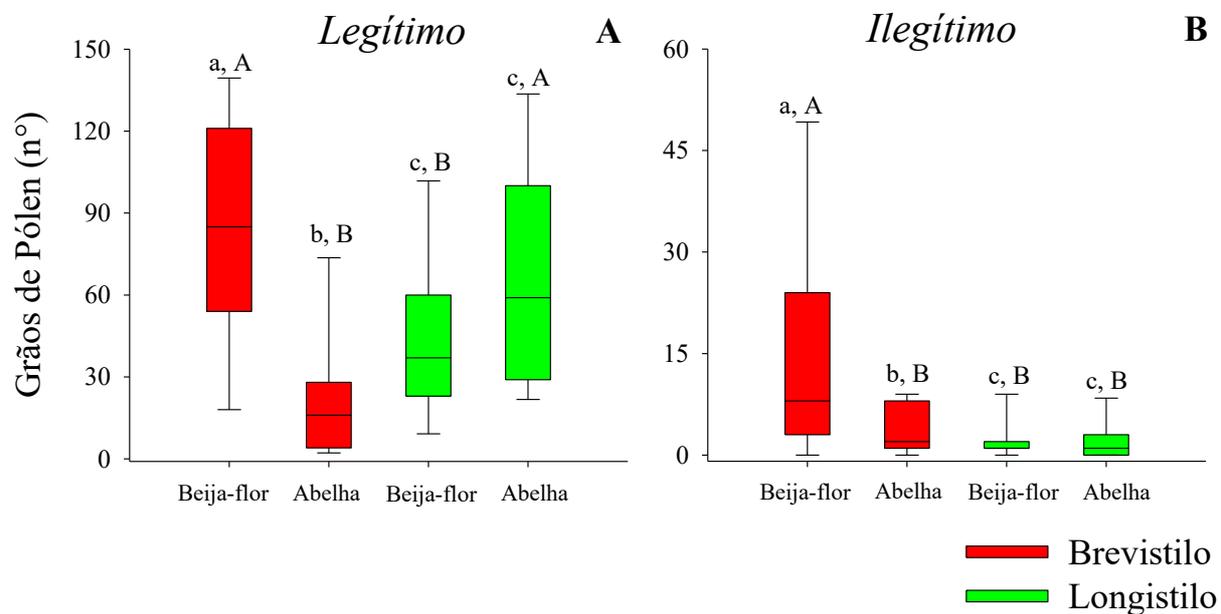


Figura 3. Número de grãos de pólen legítimo (A) e ilegítimo (B) depositados sobre a superfície estigmática dos morfo brevistilo e longistilo após uma única visita dos polinizadores abelha em *Palicourea rigida* Kunth. (Rubiaceae). Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas ($p < 0.001$) dentro de um morfo. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre polinizadores similares entre dois morfos.

Eficácia dos polinizadores na produção de frutos – O tipo de visita (controle, e uma única visita de beija-flor e abelha) e sua interação com os morfos apresentaram efeito na produção de frutos formados (Tab. 2). O morfo brevistilo apresentou diferenças entre os tipos de visitas (beija-flor, abelha e controle), de modo que o tratamento controle apresentou maior produção de frutos do que as flores visitadas uma única vez pelos beija-flores e abelhas, entretanto entre esses dois grupos de polinizadores essa diferença não foi encontrada (Fig. 4). No morfo longistilo, essa diferença ocorreu apenas entre o tratamento controle e os frutos formados pela visitas dos beija-flores, sendo que o tratamento controle produziu mais frutos (Fig. 4). A produção de frutos entre os morfos foi diferente apenas no grupo das abelhas, no qual o morfo longistilo apresentou maior produção de frutos do que o brevistilo (Fig. 4). Para os beija-flores e no tratamento controle, essa diferença não ocorreu, demonstrando que os morfos produzem frutos em quantidades semelhantes (Fig. 4).

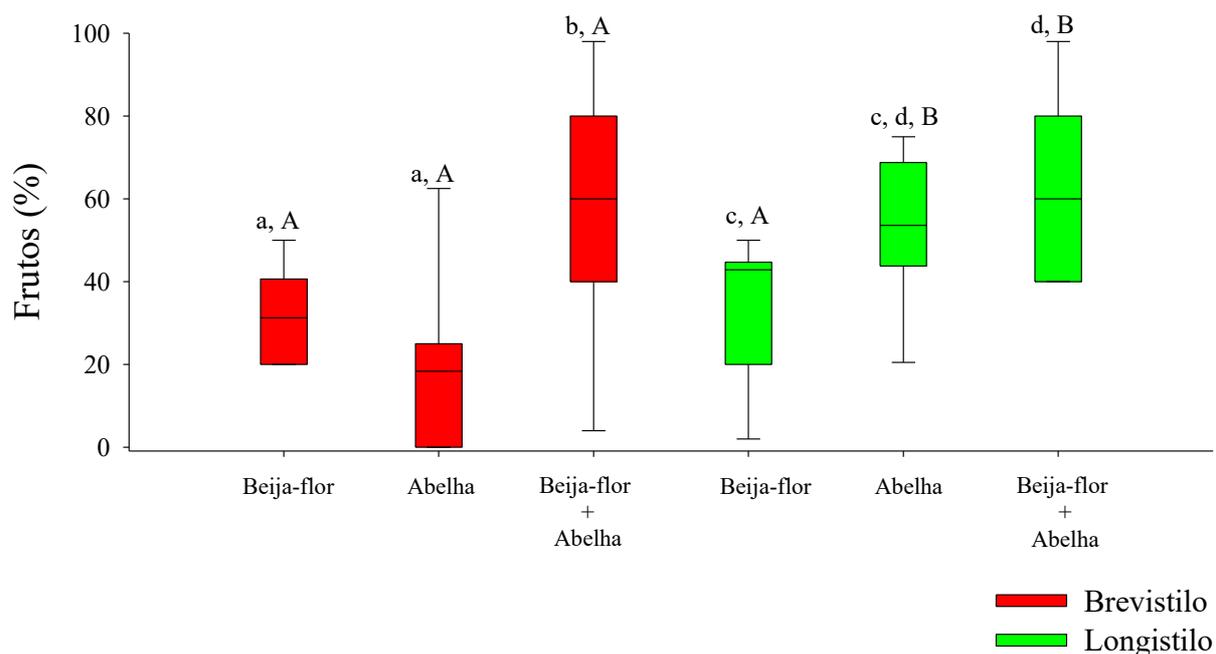


Figura 4. Porcentagem de frutos formados após uma única visita do beija-flor ou da abelha, e após visitas ao longo do dia de beija-flores e da abelhas (controle) em *Palicourea rigida* Kunth. (Rubiaceae). Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas ($p < 0.001$) dentro de um morfo. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre polinizadores similares entre dois morfos.

DISCUSSÃO

Neste estudo, foi analisada a eficácia dos beija-flores e das abelhas na deposição do pólen sobre partes específicas do corpo dos visitantes, no transporte dos grãos de pólen para os estigmas dos morfos distílicos, e no serviço de polinização a partir da produção de frutos. Assim como previsto por Darwin (1877), foi encontrado que os dois níveis de antera depositaram pólen de forma segregada no corpo dos polinizadores, os quais correspondiam com a posição do estigma do morfo oposto, fato que ocorreu independentemente do tamanho do aparelho bucal dos polinizadores (beija-flor, 18.3mm; abelha, 13.26mm). Por outro lado, os resultados de deposição de grãos de pólen sobre a superfície estigmática, mostraram que após uma única visita os beija-flores foram mais eficazes em depositar grãos de pólen legítimo do que as abelhas, especialmente no morfo brevistilo. É sabido que outros fatores interferem no fluxo de pólen em espécies distílicas, sobretudo variações nos níveis de reciprocidade (Capítulo 2), entretanto fica claro que os beija-flores são mais eficazes nessa relação do que as abelhas. Devido a esses resultados encontrados, seria esperado que a eficácia dos dois grupos de

polinizadores na produção de frutos fosse diferente, fato que não ocorreu. Esse resultado faz sentido porque a espécie em estudo apresenta apenas dois óvulos, o que facilitaria a frutificação em caso de deposição de grãos de pólen legítimos, pois somente dois grãos já seriam suficientes para a fecundação. Além disso, esses resultados conjuntamente com os do tratamento controle (beija-flores e abelhas), demonstraram como a presença desses dois grupos de polinizadores é importante para manutenção dos padrões distílicos, uma vez que quando as flores estavam expostas a esses visitantes houve um aumento considerável nas taxa de reprodução.

A hercogamia recíproca é considerada um dos principais aspectos relacionados a reprodução de plantas distílicas, sobretudo por essa característica ser a responsável por depositar os grãos de pólen de cada morfo floral em partes específicas do corpo dos polinizadores (Darwin 1877, Webb & Lloyd 1986, Lloyd & Webb 1992). Os resultados encontrados no presente estudo dão suporte a essa hipótese, de modo que nos beija-flores os grãos do morfo brevistilo foram mais depositados na base do bico e do longistilo mais presente no meio do bico. Nas abelhas, os grãos brevistilos estavam em maior quantidade na cabeça, enquanto que os do longistilo estavam depositados na proboscíde. Contudo, faz sentido pensar que em visitas naturais a setorização polínica pós-visita não deve permanecer de maneira tão categórica, pois os polinizadores apresentam comportamentos que resultam em deslocamentos dos grãos ao longo do corpo (Zhou et al. 2015), como a limpeza corpórea e/ou a retirada dos grãos para alimentar a prole. Entretanto, de alguma maneira, o possível deslocamento polínico não anula totalmente a funcionalidade da hercogamia recíproca, uma vez que os resultados de fluxo de pólen e eficácia dos polinizadores demonstram que o pólen legítimo chega no estigma correspondente. Um trabalho realizado com abelhas in-vivo e com múltiplas visitas, uma situação mais próxima do real, em espécies distílicas de *Primula* L. (Primulaceae) encontrou um resultado semelhante ao do presente estudo, de modo que foi registrado que a parte mais proximal da proboscíde apresentou mais grãos de pólen brevistilo, enquanto que a parte do meio tinha mais grãos do morfo longistilo (Keller et al. 2014). Tais resultados permitem afirmar que a hercogamia recíproca de fato deposita grãos de pólen em partes distintas do corpo dos polinizadores, independentemente, da situação (natural ou experimental) em que esses visitantes estejam submetidos. Infelizmente, nenhum trabalho nesse sentido foi realizado até o momento com os beija-flores, devido a complexidade de se trabalhar in-vivo com esse grupo de ave. Contudo, as semelhanças nos resultados encontrados em experimentos naturais e com espécimes sacrificados de abelhas, permitem pensar que esse mesmo padrão deva ocorrer para os beija-flores.

O padrão de deposição de pólen no corpo dos polinizadores é influenciado por vários traços florais e corpóreos dos visitantes, dos quais se destacam a altura dos verticilos reprodutivos e o comprimento dos aparelhos bucais dos visitantes (Keller et al. 2014, Deschepper et al. 2018). De acordo com os resultados, a altura dos verticilos reprodutivos (anteras e estigmas) da população estudada foi correspondente ao local onde os grãos de pólen legítimos foram depositados no bico e cabeça/probóscide dos polinizadores (Capítulo 2). Um fator que pode auxiliar na compreensão desses resultados encontrados é o de que os grupos de polinizadores utilizados apresentam comprimentos relativamente longos do seus órgãos (bicos e proboscídes). Um estudo realizado com *Primula veris* encontrou que o comprimento da proboscídes das abelhas teve um efeito significativo no número de grãos de pólen coletados e depositados sobre o corpo desses visitantes (Deschepper et al. 2018). Nesse estudo, ficou demonstrado que quanto mais longo o aparelho bucal dos polinizadores melhor é a separação espacial dos grãos de pólen de cada morfo no corpo dos polinizadores. Dessa forma, é plausível dizer que quanto maior for a separação estigma-antera e o comprimento dos órgãos dos polinizadores melhor será a deposição de grãos de pólen no corpo dos polinizadores e, conseqüentemente, o fluxo de pólen legítimo, tornando a relação da hercogamia recíproca com os polinizadores mais eficaz.

A combinação da taxa de visitação conjuntamente com a deposição de grãos de pólen sobre o estigma tem sido relatada como uma boa estimativa para se medir a eficiência de um polinizador (Freitas 2013, King et al. 2013, Ballantyne et al. 2015, Lehmann et al. 2019). No presente estudo, a eficácia foi avaliada, exclusivamente, a partir das taxas de deposição de pólen no estigma após uma única visita, sendo possível devido aos dois grupos de polinizadores apresentarem taxas semelhantes de visitas (beija-flores, 41.3%; abelhas 37.4 %) (Capítulo 2). Nesse sentido, os resultados encontrados mostram que a deposição dos grãos de pólen no estigma após uma única visita variou entre os grupos de polinizadores, de modo que os beija-flores foram mais eficazes em depositar grãos de pólen legítimos do que as abelhas, sobretudo no morfo brevistilo. Em contrapartida, esses dois polinizadores foram semelhantes na eficácia do morfo longistilo. Os beija-flores são polinizadores mais eficazes em plantas da família Rubiaceae, pois a eficácia desse grupo de polinizador em comparação aos insetos (inclusive abelhas) em altas altitudes é maior, porém em altitudes mais baixas tais diferenças não foram reportadas (Lehmann et al. 2019). É notório que esses grupos de polinizadores apresentam distintos padrões de eficácia, que podem ocorrer em diferentes níveis desde populacionais até entre morfos. Por outro lado, fica claro que tais diferenças ocorrem, provavelmente, em respostas ao habitat, região e sobretudo pela assembleia de polinizadores em que cada

população se encontra (Lehmann et al. 2019) e que nem sempre essas variações vão afetar os padrões reprodutivos das populações.

Cada grupo específico de polinizador também pode apresentar uma diferença na eficácia entre os morfos florais, de modo que fatores como o *display* floral de cada morfo, a hercogamia recíproca de cada morfo, e a distribuição dos morfos florais dentro das populações podem afetar essa eficácia na deposição de grãos de pólen (Lughadha & Parnell 1989, Harder & Barrett 1995, Brays & Jacquemyn 2019). Neste trabalho, todos esses fatores foram desconsiderados, pois o experimento foi realizado apenas com uma visita, de forma manual, e com espécimes empalhados de polinizadores. A partir desse experimento foi encontrado que a eficácia de cada um dos polinizadores ocorreu de forma distinta entre os morfos, pois foi observado que os beija-flores foram mais eficazes em levar grãos de pólen para o estigma brevistilo do que para o longistilo, sendo o contrário reportado para as abelhas. Em condições naturais tais diferenças podem não ser encontradas, uma vez que vários componentes podem afetar esse resultado, tais como, fatores ambientais devido às variações geográficas, deslocamento do pólen no corpo dos polinizadores depois de várias visitas, variações nos níveis de hercogamia recíproca, e padrões distintos de comprimento da corola (Cunha et al. 2014, Zhou et al. 2015, Jacquemyn et al. 2018, Novo et al. 2018). Assim, essa divisão encontrada em cada grupo de polinizador na eficácia da transferência de pólen entre os morfos, pode ser corrigida em condições naturais, principalmente devido à atuação desses fatores citados. Essa afirmação é plausível, pois a produção de frutos após em condições naturais não foi diferente entre os morfos, demonstrando que a presença de ambos os polinizadores é importante para a reprodução dessas plantas.

Em condições naturais a produção de frutos pode variar entre os morfos, sendo em alguns casos encontrados maiores quantidades no morfo longistilo, mas em outros no brevistilo, sendo também que em algumas populações tais diferenças podem não existir (Ornelas et al. 2004, Valois-Cuesta et al. 2011, Zhu et al. 2015, Wu et al. 2018). O presente trabalho utilizou apenas o sucesso reprodutivo após uma única visita, de modo que não foi encontrada diferença na eficácia dos beija-flores e abelhas. Zhu et al. (2015) avaliando a eficácia de abelhas e moscas em *Primula secundiflora* (Primulaceae) após uma única visita, encontrou que quando as flores foram visitadas pelas moscas o morfo longistilo produzia mais frutos, por outro lado quando as flores eram visitadas por abelhas que roubavam néctar a frutificação ocorreu apenas no morfo brevistilo. Contudo, quando estes autores analisaram a frutificação de forma aberta em várias populações eles encontraram que a abundância dos polinizadores foi o principal aspecto que afetou o sucesso reprodutivo. Eles encontraram que a frutificação dos morfos ocorreu de forma

parecida em populações que apresentaram uma abundância semelhante dos dois grupos de polinizadores. A abundância dos polinizadores não foi investigada no presente estudo, porém sabe-se que a taxa de visitas é semelhante entre os grupos de polinizadores (Capítulo 2). Dessa forma, essa igualdade ajuda a explicar o fato da eficácia no sucesso reprodutivo não ter sido diferente entre os beija-flores e abelhas, mesmo após estes apresentarem diferenças na deposição de grãos de pólen legítimos entre os morfos. Tais resultados demonstram que a presença de mais de um grupo de polinizador em populações distílicas é importante para a frutificação dessas plantas (Zhu et al. 2015, Deschepper et al. 2018), pois taxas de reprodução semelhantes entre os morfos pode evitar possíveis danos ao sistema distílicos, como por exemplo uma especialização sexual em cada um dos morfos florais.

Em conclusão, os dados encontrados nesse estudo demonstram que a evolução da distília a partir de diferentes níveis de anteras e estigmas (hercogamia recíproca) é realmente aplicável, pois houve uma separação espacial dos grãos de pólen dos morfos em partes distintas do seus corpos, assim como previsto (Darwin 1877, Lloyd & Webb 1992). Parcialmente, a hipótese proposta para a eficácia dos polinizadores também foi encontrada, de modo que os beija-flores foram mais eficazes em depositar grãos de pólen legítimo após uma única visita, sobretudo no estigma do morfo brevistilo, entretanto tal fato não pode ser atribuído ao comprimento maior do aparelho bucal dos beija-flores, pois essa diferença não impossibilitou uma separação espacial melhor dos grãos de pólen no corpo desse polinizador. Por outro lado, essa diferença na eficácia dos polinizadores não foi encontrada para a produção de frutos, sugerindo que ambos os polinizadores (beija-flores e abelhas) são importantes na reprodução e na manutenção dos padrões reprodutivos da espécie estudada. É sabido que diversos outros fatores podem estar associados ao processo de eficácia dos grupos de polinizadores, como a abundância dos polinizadores (Zhu et al. 2015), características florais e diferenças ambientais (Lehmann et al. 2019). Entretanto, no presente estudo nenhuma relação direta desses fatores foram feitos com a eficácia, contudo sabe-se que a frequência de visitação as flores de ambos é semelhante na população (Capítulo 2). Por fim, pode-se concluir que este trabalho revelou resultados importantes, sobre como a presença dos beija-flores e das abelhas é essencial para o aumento do sucesso reprodutivo de populações distílicas, mesmo que esses dois grupos de polinizadores apresentem peculiares distinções na funcionalidade do sistema. Além disso, esse estudo mostrou o quão é necessário conservar espécies de plantas e de polinizadores, principalmente pela qualidade do serviço ecossistêmico prestado por esses agentes.

REFERÊNCIAS

- Ballantyne, G.; Baldock, K.C.R. & Willmer, P.G. 2015. Constructing more informative plant–pollinator networks: visitation and pollen deposition networks in a heathland plant community. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 282: 14–22.
- Barrett, S.C.H. & Cruzan, M.B. 1994. Incompatibility in heterostylous plants. In: Williams, E.G.; Clarke, A.E.; Knox, R.B. eds. *Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants*. Massachusetts: Kluwer Boston, 188-219.
- Barret, S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* 3: 274-284.
- Barrett, S.C.H. & Shore, J.S. 2008. New Insights on Heterostyly: Comparative Biology, Ecology and Genetics. In: Franklin-Tong, V.E. (ed.) *Self-incompatibility in flowering plants-evolution, diversity, and mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 3-32.
- Bates, D.; Maechler, M.; Bolker, B.; Walker, S.; Christensen, R.H.B.; Singmann, H.; Dai, B.; Scheipl, F.; Grothendieck, G.; Green, P. & Fox, J. 2018. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.1-21. <https://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Brys, R.; Jacquemyn, H.; Hermy, M. & Beeckman, T. 2008. Pollen deposition rates and the functioning of distyly in the perennial *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *Plant Systematics and Evolution* 273: 1–12.
- Brys, R. & Jacquemyn, H. 2019. The impact of individual inaccuracy of reciprocal herkogamy on legitimate pollen deposition and seed set in a distylous self-incompatible herb. *Journal of ecology* doi: 10.1111/1365-2745.13258.
- Consolaro, H.; Toledo, R.D.P.; Ferreguti, R.L.; John, H. Oliveira, P.E. 2009. Distilia e homostilia em espécies de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) do Cerrado do Brasil Central. *Revista Brasileira de Biociências* 32: 677-689.
- Cunha, N.L.; Fischer, E.; Lorenz-Lemke, A.P. & Barrett, S.C.H. 2014. Floral variation and environmental heterogeneity in a tristylous clonal aquatic of the Pantanal wetlands of Brazil. *Annals of Botany* 114:1637–1649.

- Dalsgaard, B.; Martín González, A.M.; Olesen, J.M.; Ollerton, J.; Timmermann, A.; Andersen, L.H. & Tossas, A.G. 2009. Plant–hummingbird interactions in the West Indies: floral specialisation gradients associated with environment and hummingbird size. *Oecologia* 59: 757–766.
- Darwin, C. 1877. *The Different Form of Flowers of the Same Species*. John Murray, London.
- Deschepper, P.; Brys, R. & Jacquemyn, H. 2018. The impact of flower morphology and pollinator community composition on pollen transfer in the distylous *Primula veris*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 186: 414-424.
- Dulberger, R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In: Barrett, S.C.H. ed. *Evolution and Function of Heterostyly*. Berlin: Springer-Verlag, 41-84.
- Faria, R.R. & Araújo, A.C. 2015. Fruit set of distylous *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae) mediated by *Apis mellifera* (Apidae) and species of Augochloropsis (Halictidae). *Acta Botanica Brasilica* 29: 278–281.
- Fisher, R.A. 1941. The theoretical consequences of polyploid inheritance for the mid style form of *Lythrum salicaria*. *Annals of Eugenics* 11: 31-38.
- Fox, J. & Weisberg, S. 2018. *car: An {R} Companion to Applied Regression*. 3rd ed. Thousand Oaks CA: Sage. R package version 3.0-3. <https://CRAN.R-project.org/package=car>.
- Freitas, L. & Sazima, M. 2006. Pollination biology in a tropical high altitude grassland in Brazil: interactions at the community level. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 93:465–516
- Freitas, L. 2013. Concepts of pollinator performance: is a simple approach necessary to achieve a standardized terminology? *Brazilian Journal of Botany* 36: 3–8.
- Ganders, F.R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607-635.
- Gross, P. 2005. Pollination effectiveness. In: Dafni A, Kevan PG, Husband BC. (eds.) *Practical Pollination Biology*. Cambridge, Enviroquest Ltd.
- Harder, L.D. & Barrett, S.C.H. 1995. Mating cost of large floral displays in hermaphrodite plants. *Nature* 373: 512-515.

- Hernández, A. & Ornelas, J.F. 2007. Disassortative pollen transfer in distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a hummingbirds-pollinated shrub. *Écoscience* 14: 8-16.
- Jacquemyn, H.; Gielen, M. & Brys, R. 2018. Is sexual organ reciprocity related to legitimate pollen deposition in distylous *Pulmonaria* (Boraginaceae)? *Oikos* 127: 1216-1224.
- Keller, B.J.; Thomson, D. & Conti, E. 2014. Heterostyly promotes disassortative pollination and reduces sexual interference in Darwin's primroses: Evidence from experimental studies. *Functional Ecology* 28: 1413-1425.
- King, C.; Ballantyne, G. & Willmer, P.G. 2013. Why flower visitation is a poor proxy for pollination: measuring single-visit pollen deposition, with implications for pollination networks and conservation. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 811–818.
- Krauss, S.L.; Phillips, R.D.; Karron, J.D.; Johnson, S.D.; Roberts, D.G. & Hopper, S.D. 2017. Novel consequences of bird pollination for plant mating. *Trends in Plant Science* 22: 395–410.
- Lehmann, L.J.; Maruyama, P.K.; Bergamo, P. J.; Maglianesi, M.A.; Rahbek, C. & Dalsgaard, B. 2019. Relative effectiveness of insects versus hummingbirds as pollinators of Rubiaceae plants across elevation in Dominica, Caribbean. *Plant Biology* 21: 738–744.
- Lenth, R.; Singman, H.; Love, J.; Buerkner, P. & Herve, M. 2019. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>.
- Lloyd, D.G. & Webb, C.J. 1992. The evolution of heterostyly. In: Barrett SCH, ed. *Evolution and function of heterostyly*. Berlin: Springer-Verlag, 151-178.
- Lughadha, E.M.N. & Parnell, J.A.N. 1989. Heterostyly and gene-flow in *Menyanthes trifoliata* L. (Menyanthaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 100: 337-354.
- Machado, A.O.; Silva, A.P.; Consolaro, H.; Barros, M.A.G. & Oliveira, P.E. 2010. Breeding biology and distyly in *Palicourea rigida* H. B. & K. (Rubiaceae) in the Cerrados of Central Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 24: 686-696
- Novo, R.R.; Consolaro, H.; Almeida, N.M. & Castro, C.C. 2018. Floral biology of the velvetseed *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae): Atypical distyly or style dimorphism? *Flora* 239: 62-70.

- Ollerton, J.; Killick, A.; Lamborn, E.; Watts, S. & Whiston, M. 2007. Multiple meanings and modes: on the many ways to be a generalist flower. *Taxon* 56: 717-728.
- Ollerton, J.; Winfree, R. & Tarrant, S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321–326.
- Ornelas, J.F.; Jiménez, L.; González, C. & Hernández, A. 2004. Reproductive ecology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in a tropical montane cloud forest. I. Hummingbirds' effectiveness as pollen vectors. *American Journal of Botany* 91:1052–1060.
- Proctor, M.; Yeo P. & Lack A. 1996. *The natural history of pollination*. London, Harper Collins Publishers, 479p.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>.
- Taylor, C.M. 1997. Conspectus of the Genus *Palicourea* (Rubiaceae:Psychotrieae) with the Description of Some New Species from Ecuador and Colombia. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84:224-262.
- Valois-Cuesta, H.; Soriano, P.J. & Ornelas, J.F. 2011. Dimorphisms and self-incompatibility in the distylous species *Palicourea demissa* (Rubiaceae): possible implications for its reproductive success. *Journal of Plant Research* 124: 137-146.
- Waser, N.M.; Chittka, L.; Price, M.V.; Williams, N.M. & Ollerton, J. 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, 77, 1043–1060.
- Webb, C.J. & Lloyd, D.G. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24:163-178.
- Wu, Y.; Zhong, T.; Zhang, Z-Q. & Li Q-J. 2018. Pollinator-mediated selection on floral traits varies in space and between morphs in *Primula secundiflora*. *AoB PLANTS* 10: ply059.
- Zhou, W.; Barrett, S.C.H.; Wang, H. & Li, D.Z. 2015. Reciprocal herkogamy promotes disassortative mating in a distylous species with intramorph compatibility. *New Phytologist* 206: 1503-1512.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados na presente tese mostraram evidências relevantes a respeito do papel da hercogamia recíproca e dos polinizadores na reprodução de espécies de *Palicourea* e *Psychotria*. Esses achados mostraram que os aspectos morfológicos, como o comprimento da corola, são os principais responsáveis por modular a reciprocidade. Por outro lado, foi encontrado que as variações da hercogamia recíproca são mais frequentes do que a reciprocidade perfeita. A explicação para essa grande variação da reciprocidade ainda não está clara, mas acredita-se que ajustes da reciprocidade ocorram em resposta as interações plantas-polinizadores de cada local específico. Os resultados mostraram que a corola tem grande responsabilidade por tais oscilações, contudo não foi investigado quais variáveis afetam a corola e de que modo essa herança é compartilhada entre os morfos. Nesse sentido, esses resultados fornecem subsídios e incentivos para que futuros estudos evolutivos sejam realizados, sobretudo para compreender como essas informações genéticas da variação da corola são transmitidas.

Foi demonstrado que a hercogamia recíproca é funcional, pois melhores níveis de reciprocidade melhoraram a deposição de grãos de pólen legítimo entre os morfos. Entretanto, os órgãos baixos (antera longistila e estigma brevistila) foram mais recíprocos do que os altos (anteras brevistila e estigma longistila), o que acarretou uma maior deposição de pólen legítimo sobre o estigma do morfo brevistilo. Deste modo, tal correspondência demonstra que a reciprocidade, quando existe, tem um papel muito importante na reprodução de populações distílicas, principalmente pela atuação dos polinizadores. A hercogamia recíproca depositou grãos de pólen de cada morfo em partes específicas do corpo dos polinizadores (beija-flor e abelha) e ambos os visitantes foram eficazes no serviço de polinização da população estudada de *Palicourea rigida*. Esses resultados sugerem que os beija-flores e as abelhas são importantes na reprodução e manutenção dos padrões reprodutivos da população estudada, uma vez que o sucesso reprodutivo é melhor com a presença dos dois agentes, do que quando ocorre apenas uma visita de uma espécie em específico. Sendo assim, para que a funcionalidade desse mecanismo ocorra em plantas distílicas é essencial a manutenção de diferentes tipos de polinizadores. Nesse mesmo sentido fica claro como é importante conservar espécies de plantas e de polinizadores, sobretudo pela qualidade do serviço ecossistêmico prestado por esses agentes. Além disso, a abundância dos polinizadores é uma característica que está associada a eficácia dos polinizadores, devido a isso, sugere-se que novos estudos sejam realizados com

diferentes grupos de polinizadores, sobretudo em diferentes cenários que apresentem várias possibilidades de frequência de polinizadores.