

●●●●●●●●●●

# Biologia e Ecologia da Polinização

Cursos de Campo vol.3



# Biologia e Ecologia da Polinização

## Cursos de Campo

Vol. 3 ●●●●●●●●●●●●●●●●●●

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

REITORA

João Carlos Salles Pires da Silva

VICE-REITOR

Paulo Cesar Miguez de Oliveira

ASSESSOR DO REITOR

Paulo Costa Lima



EDITORA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

DIRETORA

Flávia Goullart Mota Garcia Rosa

CONSELHO EDITORIAL

Titulares

Ângelo Szaniecki Perret Serpa

Caiuby Alves da Costa

Charbel Niño El-Hani

Dante Eustachio Lucchesi Ramacciotti

José Teixeira Cavalcante Filho

Alberto Brum Novaes

SUPLENTE

Cleise Furtado Mendes

Evelina de Carvalho Sá Hoisel

Maria Vidal de Negreiros Camargo

# Biologia e Ecologia da Polinização

## Cursos de Campo

Vol. 3 

Rede Baiana de polinizadores | EDUFBA

Salvador, Bahia - 2014



©2014 by Blandina Felipe Viana e Fabiana Oliveira da Silva

Direitos para esta edição cedidos à Editora da Universidade Federal da Bahia.  
Feito o depósito legal.

### Capa, projeto gráfico

Lúcia Valeska de Souza Sokolowicz

### Revisão

Blandina Felipe Viana e Fabiana Oliveira da Silva

### Fotos da Capa

Cláudio Augusto Mondin e Edivani V. Franceschinelli

#### Sistema de Bibliotecas - UFBA

Biologia e ecologia da polinização / organizadores, Blandina Felipe Viana e Fabiana Oliveira da Silva. - Salvador : EDUFBA : Rede Baiana de Polinizadores, 2014.  
132 p. : il. - (Cursos de campo ; 3)

"Trabalhos desenvolvidos pelos participantes dos Cursos Internacionais de Campo sobre Polinização, nas edições realizadas nos anos de 2010 e 2012, em São Francisco de Paula, RS e em Alto Paraíso, GO, promovidos pela Iniciativa Brasileira de Polinizadores (IBP)".  
ISBN 978-85-232-1304-6

1. Biodiversidade - Brasil. 2. Polinização por inseto. 3. Entomologia. 4. Biologia.  
5. Ecologia. I. Viana, Blandina Felipe. II. Silva, Fabiana Oliveira da.

CDD - 577

Editora filiada à:



EDITORA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Rua Barão de Jeremoabo s/n  
Campus de Ondina - CEP 40.170-115  
Salvador – Bahia – Brasil  
Telefax: 0055 (71) 3283-6160/6164/6777  
edufba@ufba.br - www.edufba.ufba.br

Aos participantes dos Cursos Internacionais de Campo sobre Polinização de 2010 e 2012 que contribuíram com os seus trabalhos para a realização dessa obra.

# Biologia e Ecologia da Polinização

## Cursos de Campo

### Vol. 3

#### Organizadoras

Blandina Felipe Viana<sup>1</sup> e Fabiana Oliveira da Silva<sup>2</sup>

#### Revisores

Blandina Felipe Viana (Universidade Federal da Bahia – UFBA)

Betina Blochtein (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUC-RS)

Breno Magalhães Freitas (Universidade Federal do Ceará – UFC)

Edivani V. Franceschinelli (Universidade Federal de Goiás – UFG)

Favizia Freitas de Oliveira (Universidade Federal da Bahia – UFBA)

Fabiana Oliveira da Silva (Universidade Federal de Sergipe – UFS)

Felipe Wanderley Amorim (Universidade Federal do ABC – UFABC)

Helder Nagai Consolaro (Universidade Federal de Goiás - UFG)

Leonardo Galetto (Universidad Nacional de Córdoba – UNC)

Peter G. Kevan (University of Guelph - UOGUELPH)

---

<sup>1</sup> Professora Associada II do Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia (UFBA)

<sup>2</sup> Pesquisadora bolsista do Projeto de Conservação e Manejo de Polinizadores para uma Agricultura Sustentável através de uma Abordagem Ecosistêmica - Projeto Polinizadores (GEF/FAO/UNEP/MMA/FUNBIO), vinculada a Rede POLINFRUT, da Universidade Federal da Bahia.

## Agradecimentos

A trajetória de sucesso das edições dos cursos de polinização no Brasil resultou do empenho e participação constante dos nossos incansáveis parceiros Peter G Kevan (University of Guelph), Leonardo Galetto (Universidad de Cordoba), Favizia Freitas de Oliveira (Universidade Federal da Bahia) e Breno M. Freitas (Universidade Federal do Ceará). Além desses, foram também imprescindíveis os professores Betina Blochtein (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul) e Edivani V. Franceschinelli e Hélder Consolaro (Universidade Federal da Goiás), que aceitaram o desafio de organizar as edições dos cursos de 2010 e 2012, respectivamente, e cujos manuscritos compõem esta obra.

Queremos também expressar os nossos agradecimentos aos colegas que aceitaram o nosso convite para participar como colaboradores nas edições dos cursos de campo, e sem os quais a concretização dos cursos de campo sobre polinização em 2010 e 2012 não seria possível. Assim, em 2010, participaram os professores Claudio Mondin (Pontifical University Catholic of the Rio Grande do Sul); Jorge Alberto Villwock (Pontifical University Catholic of the Rio Grande do Sul); Rodrigo Singer (Federal University of the Rio Grande do Sul) e Sidia Witter (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul - Fepagro). Em 2012, os professores Paulo Eugênio Oliveira (Universidade Federal de Uberlândia); Nelson Sabino Bittencourt Junior (Universidade Estadual de São Paulo); Christian Westerkamp (Universidade Federal do Ceará); Felipe Amorin (Universidade Estadual de Campinas) e José Felipe Ribeiro (CPAC – EMBRAPA – Brasil).

Agradecemos ao Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata/PUCRS São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul - Brasil e ao Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, que receberam os cursos de polinização em 2010 e 2012, respectivamente, e que nos proporcionaram as condições adequadas à realização das atividades práticas dessas edições dos Cursos de Polinização.

Finalmente agradecemos aos monitores das duas edições, Daniela Loose Ferreira (Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Museu de Ciências Naturais); Letícia Azambuja Lopes (Pos doutoranda, Universidade Luterana do Brasil); Marcelo Casimiro Cavalcante (Universidade Federal Rural de Pernambuco); Mariana Zaniol Fernandes (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul); Patrícia Nunes da Silva (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul); Camila Nonato Junqueira (Universidade Federal de Uberlândia), Daniel de Paiva Silva (Universidade Federal do Pará); Carlos de Melo e Silva Neto (Universidade Federal de Goiás); Jose Neiva Mesquita Neto (Universidade Federal de Minas Gerais); Túlio Freitas Filgueira de Sá (Universidade Federal Rural de



Pernambuco) cujo apoio, dedicação e responsabilidade nos permitiram cumprir com os objetivos almejados para os cursos.

A realização desses cursos foi possível graças ao apoio logístico e auxílio financeiro dos seguintes parceiros: Universidade Federal da Bahia - UFBA, Universidade Federal do Ceará - UFC, University of Guelph - UOGUELPH, Universidad Nacional de Cordoba - UNC, Universidade Federal de Goiás - UFG, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, Conselho Nacional de Pesquisa - CNPQ, Ministério do Meio Ambiente - MMA, Fundo Global para o Meio Ambiente - GEF, Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO, Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente - PNUMA, Fundo Brasileiro para a Biodiversidade - FUNBIO, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, the Canadian Pollination Initiative - CANPOLIN, Confederação Brasileira de Apicultura - CBA, BIODIVERSIDADE VEGETAL, Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul - FEPAGRO, Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais – IMA-PUCRS.

## Nota dos editores

Este livro reúne os resultados dos trabalhos desenvolvidos pelos participantes dos Cursos Internacionais de Campo sobre Polinização, nas edições realizadas nos anos de 2010 e 2012, em São Francisco de Paula, RS e em Alto Paraiso, GO, promovidos pela Iniciativa Brasileira dos Polinizadores (IBP). No total foram produzidos 11 manuscritos, dos quais dois foram publicados em revistas científicas: 1) "Efficiency in pollen foraging by honey bees: time, motion, and pollen depletion on flowers of *Sisyrinchium palmifolium* (Asparagales: Iridaceae). D. P. Silva, J. Moisan-De-Serres, D. C. Souza, S. B. Hilgert-Moreira, M. Z. Fernandes, P. G. Kevan, B.M. Freitas. *Journal of Pollination Ecology*, 11(4): 27-32, 2013; 2) "Pollen aggregation in relation to pollination vector". D. Timerman, D. F. Greene, J. D. Ackerman, P. G. Kevan, E. Nardone. *International Journal of Plant Science*, 175(6): 681–687, 2014, por essa razão não constam dessa obra.

Esses cursos visam qualificar pesquisadores, docentes de instituições de ensino superior, discentes de pós-graduação e demais profissionais que atuam na área de polinização e/ou que possuem o perfil para atuarem nesta área, como futuros pesquisadores, formadores de recursos humanos e disseminadores de conhecimentos em nível local e/ou regional. O formato original desses cursos foi concebido e desenvolvido pelo Prof. Dr. Peter G. Kevan, da Universidade de Guelph no Canadá, na década de 90. No Brasil, incluindo as edições de 2010 e 2012, já foram realizadas nove edições desses cursos, sendo 05 na Bahia (Chapada Diamantina), uma no Ceará (Limoeiro do Norte) e uma no Pará (Caxiuanã), que contaram com o apoio do Programa de Pós Graduação em Ecologia e Biomonitoramento do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia e dos Programas de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais e de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Museu Emilio Goeldi e Embrapa Amazonia Oriental.

Esperamos que a publicação dessa obra contribua para despertar o interesse de jovens pesquisadores nos estudos da biologia e da ecologia da polinização e que sirva de estímulo para aqueles interessados em participar das próximas edições dos cursos de campo sobre polinização.

**Blandina Felipe Viana e Fabiana Oliveira da Silva**



# Sumário

## **13 PARTE 1 - Contribuições do curso de campo em biologia da polinização - 2010**



- 15 A paisagem e a biodiversidade na Serra Geral, RS, Brasil
- 23 Co-occurrence and floral isolation in two *Sisyrinchium species* (Iridaceae)
- 35 Estudo preliminar da relação entre os visitantes florais e a disponibilidade de néctar em *Coccocypselum pulchellum* Cham. (Rubiaceae) na Floresta de Araucária, sul do Brasil
- 45 The efficiency of pollen transfer by three species of stingless bees (*Melipona quadrifasciata* L., 1836; *Melipona bicolor* L., 1836 and *Melipona marginata* L., 1836) during the pollination of *Solanum variable*
- 55 Biologia floral de *Lupinus* sp. (Fabaceae) e espectro de visitantes, com ênfase em *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) nos campos de altitude no sul do Brasil

## **65 PARTE 2 – Contribuições do curso de campo em biologia da polinização - 2012**



- 67 A paisagem e a biodiversidade na Chapada dos Veadeiros, GO, Brasil
- 73 Nectar production and floral visitors of *Dyckia* sp. (Bromeliaceae: Pitcarnioideae) after fire in a Cerrado Rupestre
- 89 Biologia Floral, enantiostilia, sistema reprodutivo and potencial polinizadores de *Callisthene minor* Mart (Vochysiaceae), Chapada dos Veadeiros – Brazil
- 99 Comparing traditional and strategic pan trapping effectiveness in assessing bee biodiversity in the Brazilian Cerrado
- 109 Heterostilia atípica em *Rourea induta* Planch. (Connaraceae) em uma área de cerrado sentido restrito no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brasil
- 121 Visitantes florais e morfologia das glândulas de óleo de *Pterandra pyroidea* A. Juss. (Malpighiaceae)



# Parte I

Contribuições do curso de campo em biologia da  
polinização - 2010





# A paisagem e a biodiversidade na área de estudo do Curso de Ecologia da Polinização 2010 – Serra Geral, RS, Brasil

Dra. Betina Blochtein<sup>1</sup>

A 6ª edição do Curso Internacional de Ecologia da Polinização foi realizada no estado mais ao sul do Brasil, o Rio Grande do Sul, especificamente no Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata, vinculado à Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Localizado na região nordeste do Estado, entre os paralelos 29°27' e 29°35' de latitude sul e entre os meridianos de 50°15' de longitude WGr, o Centro insere-se em uma zona limítrofe entre os municípios São Francisco de Paula, Maquiné e Itati. A história sócio-econômica desta região está ligada às rotas comerciais, à pecuária nos campos nativos e ao extrativismo e beneficiamento de produtos florestais como a erva-mate, a madeira de araucária e o pinhão (MESSIAS; BRISTOT, 1998). Atualmente estão em franca expansão as culturas de *Pinus* spp., batata, hortaliças e pastagens nas partes mais altas e nas encostas e planície costeira predomina a agricultura em pequenas e médias propriedades. A sede do Pró-Mata localiza-se no município de São Francisco de Paula e a área total do Centro abrange 3.100 ha recobertos por florestas primárias e secundárias e por dois pequenos trechos com campos nativos que, apesar de terem sido explorados por muitos anos, encontram-se bem preservados. A compilação dos elementos que conformam o espaço territorial, bem como a interpretação da interação destes elementos, compõe o Plano de Manejo do Pró-Mata, elaborado em 2011 ([www3.pucrs.br/portal/page/portal/ima/Capa/promata/promataplano](http://www3.pucrs.br/portal/page/portal/ima/Capa/promata/promataplano)). Apresenta-se seguir a síntese de alguns aspectos deste documento.

## Clima

A região onde se situa o Pró-Mata enquadra-se no extremo sudeste do Domínio Climático das Araucárias (AB'SABER, 1970; 1977), que tem como características fisionômicas mais marcantes o relevo ondulado da borda leste do Planalto Meridional, com altitudes entre 900

---

<sup>1</sup> Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, atuando como diretora do Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e docente da Faculdade de Biociências ([brasilbetinabl@pucrs.br](mailto:brasilbetinabl@pucrs.br))



e 1100 m. O clima é subtropical superúmido a úmido, com um total pluviométrico anual em torno de 2.252 mm. As temperaturas médias mensais se mantêm abaixo de 15°C por um período de sete meses (abril a outubro), sendo a média no mês de janeiro de 20°C (mês mais quente), e em julho (mês mais frio) um pouco inferior a 11°C (IBGE, 1986). O número de ocorrências de geada é, em média, superior a trinta dias por ano. A região também é palco de nevadas, embora não ocorram todos os anos.

## Elementos do Relevo e solos

A paisagem encantadora do nordeste do Rio Grande do Sul é marcada pela presença de três padrões de relevo particulares, que se traduzem em panoramas diferentes: o Planalto das Araucárias, os Patamares da Serra Geral (Fig. 1) e a Planície Costeira (Fig. 2). O Planalto das Araucárias é uma superfície plana ocupada em quase toda a sua extensão pelos chamados Campos de Cima da Serra. Nas encostas dos vales se instalam as matas ornamentadas pela araucária, o pinheiro brasileiro e nas escarpas escalonadas, íngremes, onde há acumulação de solos, instala-se a exuberante Mata Atlântica. A área assim caracterizada tem sido chamada de Serra Geral. Ela faz a transição entre as terras altas do planalto e as terras baixas da planície. Entre o sopé da escarpa e as praias arenosas do oceano Atlântico estende-se a Planície Costeira. Nesta região, Litoral Norte do Rio Grande do Sul, ela é marcada por uma sucessão de cristas e pequenos terraços arenosos intercalados com depressões ocupadas por sistemas de lagos e lagoas costeiras (Fig. 2). A superfície do planalto é coberta por solos da classe Cambissolo húmico alumínico típico (CHa1) enquanto que as encostas, unidade de mapeamento *Re*, mostram uma associação de Chernossolo argilúvico férrico típico (Mtf) com Neossolo litólico eutrófico chernossólico típico (RLe1). Jungbluth e Pinto (1997). Streck *et al.*, (2002) (EMBRAPA, 1999).

**Figura 1** - *Tibouchina sellowiana* (manacá-da-serra), árvore característica da Floresta Ombrófila Densa emoldura a vista da sede do Pró-Mata para os patamares da Serra Geral



**Figura 2** - Vista da Sede do Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata em direção à planície Costeira



## Uso do solo – Ecossistemas - Flora

O Pró-Mata abriga ecossistemas remanescentes primários e em regeneração do Domínio da Mata Atlântica localizados na borda do planalto e nos topos de montanhas e encostas da Serra Geral. Estes ecossistemas e suas transições – ecótonos – representam parte das florestas do Estado do Rio Grande do Sul (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA/INPE, 2006) tombadas pela UNESCO compondo a Reserva de Biosfera da Mata Atlântica, reconhecida internacionalmente como um dos 25 *hotspots* de biodiversidade mundial (MYERS *et al.*, 2000).

Ocorrem de forma singular no Centro, os campos nativos do Planalto sem impacto do gado e de fogo desde 1994, além das extensas áreas com pinheirais (Mata com Araucária, também denominada Floresta Ombrófila Mista) contínuos ao longo da borda do Planalto, que por vezes termina em escarpas abruptas. Nos topos das montanhas e nas encostas, abunda a verdejante Mata Atlântica *stricto sensu* que abriga uma notável riqueza de elementos tropicais da flora e fauna. A área caracteriza-se por possuir uma grande extensão de florestas em diferentes estágios sucessionais (Fig. 3 e Fig. 4), devido às atividades antrópicas ocorridas no passado.

Na Mata com Araucária destacam-se, no estrato emergente, o pinheiro brasileiro (*Araucaria angustifolia*) (Fig. 5), guamirim-ferro (*Myrcia retorta*), canela-lajeana (*Ocotea pulchella*), bracatinga (*Mimosa scabrella*) e o brinco-de-princesa (*Fuchsia regia*) (Fig. 6); no estrato dominante, podem ser observadas casca-d'anta (*Drimys brasiliensis*), o cambolim (*Siphoneugena reitzii*, *Myrciaria floribunda*) e o guamirim (*Myrceugenia euosma*). A Floresta Ombrófila Densa apresenta composição florística diversificada ao longo do gradiente altitudinal, estando presentes a canela-preta (*Ocotea* spp.), e mirtáceas dos gêneros *Eugenia*, *Myrceugenia* e *Calypttranthes*. Nas áreas de campo *Andropogon lateralis* (capim-caninha) a espécie dominante e comumente é acompanhada por espécies de *Baccharis* (TEIXEIRA; COURA NETO, 1986; BERTOLETTI; TEIXEIRA, 1995). No Catálogo Fotográfico de Plantas do Pró-Mata ([http://www3.pucrs.br/pucrs/ima\\_novo/downloads/catalogo-plantas.pdf](http://www3.pucrs.br/pucrs/ima_novo/downloads/catalogo-plantas.pdf)) e no Guia de flores do Pró-Mata ([http://www3.pucrs.br/pucrs/ima\\_novo/galeria/](http://www3.pucrs.br/pucrs/ima_novo/galeria/)) são disponibilizadas imagens representativas da flora regional.

**Figura 3** - O estudo da vegetação em estágio inicial de sucessão foi ambientado pela neblina de ocorrência frequente no Planalto das Araucárias



**Figura 4** - Vegetação em estágio avançado de sucessão da Floresta Ombrófila Mista.



**Figura 5** - *Araucaria angustifolia* (pinheiro-brasileiro), espécie que determina a fisionomia da Floresta Ombrófila Mista.



**Figura 6** - Elemento marcante nas bordas da Floresta Ombrófila Mista o brinco-de-princesa (*Fuchsia regia*) é a flor símbolo do Rio Grande do Sul.

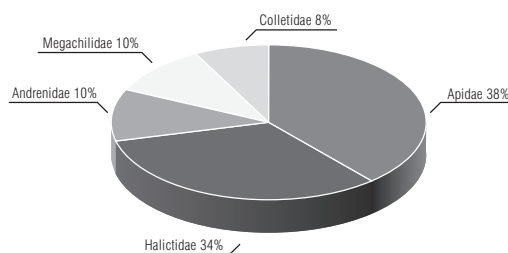


## Fauna – Enquadramento biogeográfico e diversidade

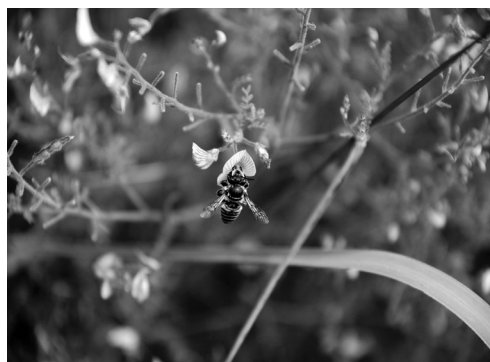
Biogeograficamente o Pró-Mata insere-se na Província Bosque de *Araucaria angustifolia*. Sua fauna, entretanto, possui também alguns elementos da chamada Província Bosque Atlântico Brasileiro. Ambas as províncias pertencem à sub-região Paranaense, no domínio da região biogeográfica Neotropical (MORRONE, 2004). Segundo Cabrera e Willink (1969), a fauna da Província Paranaense é subtropical, com alguns elementos andino-patagônicos, sendo difícil traçar um limite desta com a fauna do Chaco, do cerrado e da região atlântica.

É notável a riqueza de diversos grupos de fauna no CPCN Pró-Mata. Além de diversos outros táxons, estudos contemplam besouros (MECKE, 2001; MECKE *et al.*, 2000; 2001; MECKE; GALILEO, 2002), borboletas e mariposas (CORSEUIL *et al.*, 2001). A apifauna registrada no Planalto das Araucárias é representada por 191 espécies (<http://spling.cria.org.br/manager/detail?resource=MCP>) das famílias (Fig. 7) Andrenidae, Colletidae, Halictidae, Megachilidae (Fig. 8) e Apidae. Dentre as espécies de abelhas registradas

**Figura 7** - Diversidade relativa das abelhas registradas no Planalto das Araucárias do Rio Grande do Sul.



**Figura 8** - Fêmea de abelha corta-folha da família Megachilidae em flor de *Adesmia*



destacam-se espécies raras e quatro ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul (BLOCHTEIN; HARTE-MARQUES, 2003), a exemplo da *Melipona quadrifasciata*, conhecida com mandaçaia (Fig. 9).

A diversidade de aves registradas no Pró-Mata corresponde a cerca de 40% das espécies do Rio Grande do Sul, compiladas por Bencke (2001). A maioria é típica de ambientes florestais e diversos representantes de espécies raras ou ameaçadas no Rio Grande do Sul foram observados no local (MÄHLER; FONTANA, 1999; FONTANA; MAURÍCIO, 2002). Pacheco e colaboradores (2002) estimam que a fauna de mamíferos do Planalto das Araucárias compreende 92 espécies, dentre estas o morcego-borboleta-avermelhado, *Myotis ruber*, único quiróptero ameaçado de extinção no Rio Grande do Sul.

**Figura 9** - Abelha mandaçaia, *Melipona quadrifasciata*, em flor de *Tibouchina* sp



**Figura 10** - Professores e equipe coordenadora local da 8ª edição do Curso Internacional de Ecologia da Polinização: Leonardo Galetto, Blandina Viana, Betina Blochtein, Breno Freitas, Fabiana Oliveira da Silva, Sídia Witter, Favizia Freitas de Oliveira, Peter Kevan, Patrícia Nunes Silva, Letícia Lopes, Marcelo Casimiro, Daniela Loose e Mariana Zaniol Fernandes



## Considerações finais

O propósito pedagógico do Curso Internacional de Polinização é amplamente reconhecido na comunidade acadêmica e novamente nesta edição oportunizou a qualificação de estudantes e profissionais. As experiências instigantes e enriquecedoras vividas durante o curso repercutem positivamente na atuação educacional e/ou científica dos participantes do curso, bem como de apicultores, meliponicultores e colaboradores envolvidos em atividades desenvolvidas regionalmente. O desafio dos professores do Curso e da equipe coordenadora local (Fig. 10) de alcançar o extremo sul do Brasil foi compensador e atendeu objetivos restabelecidos para o Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata/PUCRS com a realização de estudos aprofundados dos ecossistemas naturais, num processo de aperfeiçoamento de profissionais que deverão gerenciar o ambiente em benefício da sociedade.

## Referências

- AB'SABER, A. N. Províncias Geológicas e Domínios Morfoclimáticos no Brasil. *Geomorfologia*, n. 20, p. 1-26, 1970.
- AB'SABER, A. N. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. Primeira aproximação. *Geomorfologia*, n. 52, p. 1-22, 1977.
- BENCKE, G. A. Lista de referência das aves do Rio Grande do Sul. Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (Publicações Avulsas FZB, 10). Porto Alegre, p. 104, 2001.
- BERTOLETTI, J. J.; TEIXEIRA, M. B. Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata: Plano de Trabalho para a Elaboração do Plano de Manejo. Divulgações do Museu de Ciências e Tecnologia- UBEA/PUCRS, Rio Grande do Sul, n. 3, p. 3-27, 1995.
- BLOCHTEIN, B.; HARTE-MARQUES, B. Hymenoptera. In: FONTANA, C.S.; BENCKE, G. A.; REIS, R.E. dos. Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Edipucrs, p. 95-109, 2003.
- CABRERA, A. L.; WILLINK, A. Biogeografía de América Latina. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, 1969.
- CORSEUIL, E.; SPECHT, A.; LANG, C. Esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) ocorrentes no Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata. Divulgações do Museu de Ciências e Tecnologia- UBEA/PUCRS, v. 6, p. 95-108, 2001.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa em Solos. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 412, 1999.

IBGE. Projeto RADAM BRASIL. *Levantamento de Recursos Naturais*. Folha SH. 22. Porto Alegre e parte das folhas SH. 21 Uruguaiana e Sl. 22 Lagoa Mirim. Rio de Janeiro, IBGE, v. 33, 1986.

FONTANA, C. S.; MAURÍCIO, G. N. Diagnóstico preliminar da avifauna no Planalto das Araucárias, Rio Grande do Sul: Distribuição e Status de Conservação. Relatório do Projeto Subsídios para o Diagnóstico Ambiental do Planalto das Araucárias – volume III – Vertebrata. 2002.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, INPE. *Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1995 – 2000*. São Paulo, Fundação Mata Atlântica, 2001.

JUNGBLUT, M.; PINTO, L. F. S. Levantamento de solos do Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata. *Divulgações do Museu de Ciências e Tecnologia- UBEA/PUCRS*, v. 3, p. 29-94, 1997.

MÄHLER, J. K. F.; FONTANA, C. S. Os Falconiformes no Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata: riqueza, status e considerações para a conservação das espécies no nordeste do Rio Grande do Sul. *Divulgações do Museu de Ciências e Tecnologia- UBEA/ PUCRS*, v. 5, p. 129-141, 1999.

MECKE, R. *Xylobionte Insekten an der Araukarie (Araucaria angustifolia) in Rio Grande do Sul, Brasilien*. 2001. Tese [doutorado]. Universität Tübingen, Tübingen, 2001.

MECKE, R.; GALILEO, M. H. M. Levantamento dos insetos aucariófagos no Pró-Mata, município de São Francisco de Paula, RS. Relatório do Projeto Subsídios para o Diagnóstico Ambiental do Planalto das Araucárias. Volume II - Fauna, Mollusca e Arthropoda, 2002.

MECKE, R.; GALILEO, M. H. M.; ENGELS, W. New records of insects associated with Araucaria trees: Phytophagous coleopterans and hymenopterans and their natural antagonists. *Studies on Neotropical. Fauna and Environmental*, v. 36, p. 113-124, 2001.

MECKE, R.; GALILEO, M. H. M.; ENGELS, W. Insetos e ácaros associados à *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae, Coniferae) no sul do Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*, v. 88, p. 165-172, 2000.

MESSIAS, L. G. P.; BRISTOT, A. As atividades econômicas em São Francisco de Paula e o seu desenvolvimento sustentável. In: RICHTER, M. *Conservação da Biodiversidade e Desenvolvimento Sustentável de São Francisco de Paula: Um Plano de Ação Preliminar*. Porto Alegre, Edipucrs, 1998.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL. Plano de Manejo do Centro de Pesquisas e conservação da Natureza Pró-Mata. Porto Alegre: PUCRS, 2011, Disponível em: <[www3.pucrs.br/portal/page/portal/ima/Capa/promata/promataplano](http://www3.pucrs.br/portal/page/portal/ima/Capa/promata/promataplano)>. Acesso em: 18 ago. 2013.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL. Guia de flores do Pró-Mata. Porto Alegre: PUCRS, 2011. Disponível em: <[http://www3.pucrs.br/pucrs/ima\\_novo/galeria/](http://www3.pucrs.br/pucrs/ima_novo/galeria/)>. Acesso em: 20 set. 2013.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL. Catálogo de Plantas do CPCN Pró-Mata. Porto Alegre: PUCRS, 2013. Disponível em: <[http://www3.pucrs.br/pucrs/ima\\_novo/downloads/catalogo-plantas.pdf](http://www3.pucrs.br/pucrs/ima_novo/downloads/catalogo-plantas.pdf)>. Acesso em: 20 set. 2013.

MORRONE, J. J. Panbiogeografía, componentes bióticos y zonas de transición. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 48, n. 2, p. 149-162, 2004.

MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, n. 403, p. 853-858, 2000.

PACHECO, S. M. *et al.* Mamíferos em florestas com araucárias. Relatório do Projeto Subsídios para o Diagnóstico Ambiental do Planalto das Araucárias – Volume III – Vertebrata, 2002.

STRECK, E. V. *et al.* Solos do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, EMATER/RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

TEIXEIRA, M. B. *et al.* Vegetação. *In*: IBGE. Levantamento de Recursos Naturais. v. 33, p. 541-632, 1986.

# Co-occurrence and floral isolation in two *Sisyrinchium* species (Iridaceae)

Fabiana Palmeira Fragoso<sup>1</sup>

Karin Steijven<sup>2</sup>

Mainara Figueiredo Cascaes<sup>3</sup>

Rafaela Lorena da Silva Santos<sup>4</sup>

Marcelo Casimiro Cavalcante<sup>5</sup>

Sympatric species that overlap in flowering times may undergo a variety of selective pressures, leading to character convergence or divergence and increased or decreased reproductive success. On one hand, co-occurring flowering species may act as mutualists because they can enhance pollinator visitation rates for both species (RATHCKE, 1988) by providing complementary rewards. On the other hand, when two co-flowering species attract at least one common pollinator, a reproductive disadvantage may accrue to individuals of each or both species which flower in the presence of the other species compared to those which flower alone (WASER, 1978). Thus sympatric species may compete for pollination services in several ways, one of them being interspecific pollen deposition. Such interspecific pollen transfer may adversely affect reproductive success due to stigma clogging or production of inviable seeds and unfit hybrids (YANG *et al.*, 2007).

To avoid the heterospecific pollen transfer some species have isolation mechanisms that form barriers to gene flow. This mechanisms can be subdivided into two main categories: prezygotic and postzygotic isolation. Prezygotic isolation can be either mechanical or behavioural. Flowers with entomophilous syndromes typically differ in pigmentation, form or scent, and these differences form the basis for behavioural or mechanical isolation by limiting or precluding inter-specific pollen flow (LEVIN, 1968). Mechanical isolation occurs when two or more species of flower have adapted shape or size to their specialist pollinators body shape and size. Consequently, more generalist pollinators are excluded from reaching the pollen and other floral rewards. Behavioural isolation occurs when floral signalling affects

---

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo (fabianafragoso@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Wageningen University (karin.steijven@wur.nl)

<sup>3</sup> Universidade do Extremo Sul Catarinense (mainaracascaes@hotmail.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal da Bahia (rafaelalorena@gmail.com)

<sup>5</sup> Universidade Federal do Ceará (marcelufc@yahoo.com.br)



the activities of different pollinators. Postzygotic isolation acts through internal reproductive barriers, it can prevent the pollen germination and fruit/seed growth (YANG *et al.*, 2007).

A study by Leite and Machado (2007) on two sympatric species of Marantaceae, showed overlapping flowering time but without shared common pollinators. Differences between the flowers of these species were colors, nectar sugar concentration, and corolla length. Another study with two *Dalechampia* species showed differences in resin gland size, display of staminate and pistillate flowers, the time of the day that inflorescence bracts were opened, and in the suite of pollinators (ARMBRUSTER, 1981). The differences between the flowers of the sympatric species on both examples probably reflect isolation mechanisms originated by competition for pollinators. These changes on flower traits may occur due to male and female function losses by interspecific pollen transfer, which may lead to important ecological and evolutionary consequences (MORALES; TRAVESET, 2008)

In southern Brazil, sympatric species of *Sisyrinchium* (Iridaceae) overlap in their flowering times. The genus *Sisyrinchium* comprises nearly 200 species (JOHNSTON, 1938) that occur in temperate climate or tropical climate at relatively high altitudes and low temperatures (CHUKR; CAPELLARI, 2003). Ten species of this genus occur in Rio Grande do Sul, in the temperate *Araucaria* forest (TRUYLIO *et al.*, 2002). We observed the co-occurrence and flowering overlap between two species, *Sisyrinchium palmifolium* L. and *Sisyrinchium micranthum* Cav., at Pró-Mata Conservation and Research Center.

*S. palmifolium* is a grassland species, native of Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais and Bahia (CHUKR; CAPELLARI, 2003). It is an abundant species in the south of Brazil (AITA, 2009) and has delicate yellow flowers. *S. micranthum* is also a grassland species with delicate flowers whose color may vary between white, yellows and lilac. In Brazil, this species occurs at the states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo and Rio de Janeiro (CHUKR; CAPELLARI, 2003).

Our aim was to evaluate what mechanisms the two *Sisyrinchium* species use to prevent interspecific pollen deposition. We studied floral traits (both flower morphology and phenology) and we also studied which insects visit the flowers of the two *Sisyrinchium* species (potential pollinators). Our hypotheses were that pollen deposition events are separated 1) in time by differential floral phenology, and 2) pollen deposition events are separated by partitioning of pollinators.

## Material and Methods

### *Study area*

The study was carried out in Pró-Mata Conservation and Research Center (29°30'S and 50°10'W), in São Francisco de Paula municipality, Rio Grande do Sul state, Brazil. This area is a forest reserve of about 5,000ha located on Serra Geral, at elevations of 600-1000

meters. Three main phytoecological regions are present on the site: mixed ombrophile forest, dense ombrophile forest (both vegetation types of Atlantic Rain Forest) and open grassland (VELOSO; GÓES-FILHO, 1982). The regional climate is classified as wet, with 2,252 mm of annual rainfall and means annual temperature of 15°C.

### *Experimental design*

In order to evaluate what mechanisms prevent interspecific pollen deposition between the two *Sisyrinchium* species, we established a 50m transect where all the observations and sampling took place. The data collection was made on December 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> 2010, comprising 21 hours of field work. The field team was comprised by four members who worked always in pairs in each experiment. The details are described below.

### *Floral traits*

Flower anthesis and senescence were observed in the field on both working days. Floral traits were observed in the field and also in the laboratory with a stereomicroscope. In the field marked flowers were observed from 5:00AM to 4:30PM to determine their opening time and senescence period. Corolla shape and colour were determined by direct visual observations. Other floral traits, as presence of trichomes, were observed by flower dissection under stereomicroscope. Stigma receptivity, pollen release, and pollen viability were evaluated (all according to Dafni *et al.*, 2005) shortly after the anthesis and just before the flowers closure; ten buds of each species for each treatment (n=60) were marked with colored threads and bagged to prevent access by insects on the flowers until the tests were performed.

Stigma receptivity was investigated using peroxidase reaction according to Dafni *et al.*, (2005). Five stigmas of each species (n=10 after flower opening and n=10 before its closure) were submerged in 3% hydrogen peroxide solution. Pollen release was determined by observing anthers opening and pollen exposure in five flowers of each species also in each period (n=10 after flower opening and n=10 before its closure). Pollen viability was analyzed each period using two anthers per flower per species; the pollen grains were colored with neutral red solution and for each slide we counted a sample of 50 pollen grains under the microscope. Those that took up the stain and became coloured were scored as viable. The percentage of viable pollen was calculated using the formula

$$\% \text{ pollen viable} = \frac{\text{number of colored grains}}{50} \times 100$$

### *Visitation pattern*

We set up two plots of 1m x 1m around the flowers of *S. micranthum* and *S. palmifolium* in order to evaluate the insect visitation rates to the flowers. During flower anthesis of both species on December 1<sup>st</sup>, each plot was simultaneously followed by one observer for 20

minutes each hour. We counted the number of visits to the flowers inside the plot. Additionally two member of the field team walked a 50m transect, counting visits to both flowers species during each netting session.

### *Flower visitors*

During the transect walks we captured as many flower-visiting insects as possible. The insects visiting *S. micranthum* and *S. palmifolium* flowers were captured using entomological nets, killed in ethyl acetate killer chambers and stored for further identification. Two people aerially netted insect visitors by walking within a ~50x4 m area for 20 minutes period per hour during both species anthesis. We examined the body parts of all insects collected in order to search for pollen grains. The insect visitors were identified to the lowest taxonomic level possible by Favízia Freitas de Oliveira from Universidade Federal da Bahia, and deposited at the entomological collection of the same University.

## Results

### *Floral traits*

The flowers of *S. palmifolium* are homogeneous yellow and have a dish-shaped corolla (Fig. 1A), with pollen grains being the only available floral resource (ca. 32,000 grains per flower) for pollinators. In contrast, *S. micranthum* has lilac flowers with a yellow center, a cup-shaped perianth and both pollen (ca. 9,250 grains per flower) and oil produced in trichomes as rewards to flowers visitors (Fig. 1B).

**Figure 1** - *S. palmifolium* (A) and *S. micranthum* (B) flowers. Note the exposed reproductive parts of *S. palmifolium* in contrast with *S. micranthum* anthers and stigma inside the corolla tube. The oil trichomes (elaiophores) are located at the base of the staminal tube (arrow)



*S. palmifolium* flowers opened before *S. micranthum* and they generally also closed earlier. Anthesis and senescence were however highly variable, probably due to variation

in cloudiness and humidity during the study. Stigma receptivity as well as pollen release and viability ( $n=10$  after flower opening and  $n=10$  before its closure for each treatment) comprised the entire anthesis period, which lasted from 8:30AM to noon in *S. palmifolium* and from 8:30AM to 4:30PM in *S. micranthum*. There was no decline of pollen grain viability for both *Sisyrinchium* species during the period of flower longevity: 94% and 96% of viable pollen were found on *S. palmifolium* slides at the beginning and ending of anthesis respectively, whereas 86% and 84% pollen were found viable for *S. micranthum*.

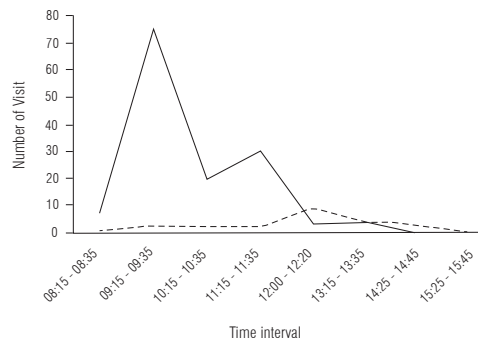
### Visitation pattern

We pooled the data from each period for both plots observed (Fig. 2). Daily visitation patterns of *S. palmifolium* visitors showed a main peak from 09:15AM to 09:35AM and a smaller one from 11:15AM to 11:35AM. Conversely, visitation pattern of *S. micranthum* seemed more or less even, with only a slight peak at noon.

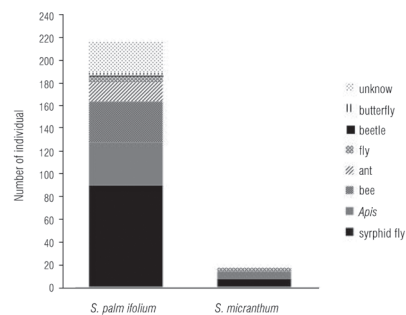
### Flower visitors

We observed 233 interactions between flower-visiting insects and both plant species surveyed. *S. palmifolium* was visited by 93% of the visitors, which belong to eight morphospecies, and only three morphospecies were collected on *S. micranthum* (Fig. 3). Among these visitors, we collect a total of 91 individuals belonging to three orders. *S. palmifolium* flowers were visited by 84 insects (92%) in the orders Diptera, Hymenoptera and Coleoptera whereas *S. micranthum* flowers were visited by 7 individuals (8%) in Diptera and Hymenoptera.

**Figure 2** - Daily visit pattern to *S. palmifolium* (continuous line) and *S. micranthum* (dashed line) flowers at Pró-Mata Conservation and Research Center, RS, Brazil



**Figure 3** - Number of flower-visiting insects by morphospecies in *S. palmifolium* and *S. micranthum* flowers at Pró-Mata Conservation and Research Center, RS, Brazil



**Figure 4** - Hoverfly (*Syrphidae* sp 1) visiting *S. palmifolium*; this is the only insect species that visited both *Sisyrinchium* species



A total of 20 species were collected on the flowers of *S. palmifolium*, where Hymenoptera was the most diverse order, with 13 species (65%), followed by Diptera with 6 species (30%) and Coleoptera with only one species (5%) (table 1). Among the visitors of *S. micranthum*, one of the four species collected was from Hymenoptera and 3 were from Diptera. Three visitor species were exclusive of *S. micranthum*, and only one – a syrphid fly showed on figure 4 – occurred on both *Sisyrinchium* species.

Only the Hymenoptera species were identified to species level (Tab. 1). Among the bees, Apidae and Halictidae families had similar diversity, with 6 and 8 species respectively. The most abundant visitors were a syrphid fly (Fig. 4) with 39 individuals and the honeybee *Apis mellifera*, with 17 individuals.

**Table 1** - Flower-visiting insects of *S. palmifolium* (Sp) and *S. micranthum* (Sm) flowers at Pró-Mata Conservation and Research Center, RS, Brazil

Order	Family	Species	Number of individuals	Sp	Sm
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera scutellata</i> Lepeletier	17	x	
-	-	<i>Ceratina (crewella)</i> sp.	1	x	
-	-	<i>Lanthonomelissa betinae</i> Urban	3		x
-	-	<i>Plebeia droryana</i> Friese	1	x	
-	-	<i>Plebeia remota</i> Holmberg	2	x	
-	-	<i>Schwarziana quadripunctata</i> Holmberg	4	x	
-	Halictidae	<i>Augochlora</i> sp 1	1	x	
-	-	<i>Augochlorodessp</i>	1	x	
-	-	<i>Dialictus</i> sp 1	3	x	
-	-	<i>Dialictus</i> sp 2	3	x	
-	-	Formicidae sp	1	x	
-	-	<i>Paroxystaglossa</i> sp 2	2	x	
-	-	<i>Paroxystaglossa</i> sp 3	1	x	
-	-	<i>Pseudagapostemon</i> sp	1	x	
Diptera	Syrphidae	Syrphidae sp 1	39	x	x
-	-	Syrphidae sp 2	1	x	
-	-	Syrphidae sp 3	4	x	
-	-	Syrphidae sp 4	1		x
-	-	Diptera sp 1	1		x
-	-	Diptera sp 2	1	x	
-	-	Diptera sp 3	1	x	
-	-	Diptera sp 4	1	x	
Coleoptera		Coleoptera sp 1	1	x	

Except for 2 individuals (5%) of Syrphidae sp 1 (Fig. 4), no species of Diptera had pollen grains in any body part. The bees *Ceratina (Crewella)* sp and *Paroxystaglossa* sp 2 as well as Formicidae sp also showed no pollen grains on their bodies; we found pollen on the abdomen (*Paroxystaglossa* sp 3) and corbiculae of all other bee species. The only individual of Coleoptera presented pollen grains all over its body. Among the four visitor species of *S. micranthum*, only *Lanthanomelissa betinae* individuals (Fig. 5) carried pollen grains.

**Figure 5** - Oil collecting bee, *Lanthanomelissa betinae*. This bee was found exclusively on *S. micranthum*, and it was the only specimen from this flower on which pollen grains were found



## Discussion

Interspecific pollen transfer occurs frequently between sympatric species (WASER, 1978; MCLERNON, 1996; MURCIA; FEISINGER, 1996; MORALES; TRAVESET, 2008) and is one of the mechanisms underlying potential competition among plants for pollinators. The quantity of foreign pollen grains received by a flower stigma may be affected by factors such as floral neighborhood (YANG *et al.*, 2007), floral form (LEVIN, 1968), flowering time (CARUSO; ALFARO, 2000), and pollinator movements (FLANAGAN *et al.*, 2009). That means that plant mechanisms to reduce the amount of interspecific pollination and/or competition for pollinator services may vary widely.

The co-flowering *Sisyrinchium* species studied here appear to have evolved some of these mechanisms to avoid the interspecific pollen transfer among their individuals. Temporal isolation is not one of them. Our results indicate that pollen deposition events are not separated in time: anthesis and senescence periods, as well as stigma receptivity, pollen release and pollen viability were almost identical for both species. Although open flowers are somewhat separated in time, because *S. palmifolium* flowers opened a little earlier and *S. micranthum* flowers lasted a little longer, most part of their anthesis period overlap. On the other hand, our hypothesis regarding the partitioning of pollinators were found to be correct.

While *S. palmifolium* offers only pollen as floral reward, *S. micranthum* offers both pollen and oil to flower visitors. Besides that, the quantity of pollen grains of *S. palmifolium* is three times greater than the quantity in *S. micranthum*. These factors are certainly related to the different flower-visiting insects found in each species. For example, plants that produce oil are able to capture a segment of the pollinator community not used by other plants in a community (NEFF; SIMPSON, 1981). The fact that, among the bees collected, *Lanthanomelissa betinae* was exclusive of *S. micranthum*, clearly suggests that. This species is a well-known oil-collecting bee (Neff; Simpson, 1981; Alves-dos-Santos *et al.*, 2009) and has been reported as a pollinator for *S. micranthum* in other studies (COCUCCI; VOGEL, 2001, TRUYLIO *et al.*, 2002). In fact, the individuals of *L. betinae*, as well as most of the collected bees carried

pollen (the exceptions *Ceratina (crewella) sp* and *Paroxystaglossa sp2* may be explained by the low number of individuals collected). Conversely, the only insect species (a syrphid fly) occurring in both plant species is probably not a pollinator, because 95% of the individuals carried no pollen grains.

Moreover, both floral display and floral resources are relevant traits on attracting different flower visitors. The bright yellow and dish-shaped corolla of *S. palmifolium* flowers compared to the lilac and cup-shaped perianth of *S. micranthum* could be responsible for attracting different types of pollinators. It is known that insects can discriminate between different floral outlines and color phases (KEVAN; BAKER, 1983; BARTH 1991) and Levin (1968) had demonstrated that the incidence of interspecific pollination by lepidopterans on *Phlox* is related to the similarity of two species in corolla outline and color. Thus the corolla color and shape of both species may be the first mechanism regulating improper pollen transfers, by acting as an important signal for particular visitors.

In addition, the corolla shape of *S. palmifolium* allows the reproductive organs of the flower to be exposed, whereas the stamens and stigma of *S. micranthum* are hidden inside the corolla tube. Although there are exceptions, these contrasting features are expected to attract more generalist visitors in the first case – dish to bowl shapes – and specialized ones in the second – tube shape (RAMÍREZ, 2003).

Closely related species may differ considerably in their rewards (both quantitatively and qualitatively) due to adaptation to different pollinators. In a study of two co-occurring congeneric species, DAFNI *et al.*, (1987) found that their nectar volume and concentration were different and for that reason one species was pollinated mainly by hawkmoths while the other was pollinated by bees. Accordingly, we found that *S. palmifolium* attracts more generalist pollinators (honeybees and other 13 bee species, besides the syrphid flies) and *S. micranthum*, specialized ones (as it is the case of *Lanthanomelissa betinae*), and that this fact appear to be related to their different floral display and floral rewards.

The hypothesis of divergence of floral form among co-flowering sympatric species sharing pollinators as a way of avoiding interspecific pollen transfer has received support from different authors (CARUSO, 2000; YANG *et al.*, 2007). If the evolutionary force promoting character displacement in sympatric species habitat affinity, flowering times, and floral form (MORALES; TRAVESET, 2008) is acting upon *S. palmifolium* and *S. micranthum*, the last character was the only one affected here. As discussed by Kevan and Baker (1983) on their extensive review about insects as flower visitors and pollinators, plants competing for pollinators and pollinators competing for floral resources may result in character displacement and resource partitioning, in order to minimize competition. Alternatively, competitive avoidance might be achieved not by those types of divergence but by traits that confer independence of animal pollinators, like self-pollination and thus future studies assessing the compatibility systems of these species should be interesting.

## Conclusion

*Sisyrinchium palmifolium* and *S. micranthum*, although sympatric at Pró-Mata Conservation and Research Center, apparently have segregated pollen flows. This segregation occurs because the species have different floral displays and *S. micranthum* presents oil besides pollen as reward for pollinators, causing the species to have different flower-visiting insects. The observation of such floral traits as we have done here are important to provide insights of how divergence in flowering times and evolution of floral form have potentially important ecological and evolutionary implications.

## Acknowledgements

We thank all the professors from Pollination Course for sharing their knowledge with us and the Pró-Mata staff for allowing us a great stay. We are especially grateful to Favízia Freitas de Oliveira for insect species identification and Leo Galleto for his constant help and thoughtful advice.

## References

- ALVES-DOS-SANTOS, I.; GAGLIANONE M. C.; NAXARA S. R. C.; ENGEL M. S. Male sleeping aggregations of solitary oil-collecting bees in Brazil (Centridini, Tapinotaspidini, and Tetrapedini; Hymenoptera: Apidae). *Genetic and Molecular Research*, v. 8, n. 2, p. 515-524, 2009.
- ARMBRUSTER, W. S. Sistemas de polinização de duas espécies de simpátricas de *Delechia* (Euphorbiaceae) no Amazonas. *Acta amazônica*, v. 11, n. 1, p. 13-17, 1981.
- AITA, A. M. Taxonomia do complexo *Sisyrinchium palmifolium* L. (Iridaceae) ocorrentes na região Sul do Brasil. Porto Alegre, 2009. Trabalho de conclusão de curso (Graduação). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
- BARTH, F. G. *Insects and flowers: the biology of a partnership*. New Jersey: Princeton University Press, 1991.
- CARUSO C. M.; ALFARO M. Interspecific pollen transfer as a mechanism of competition: effect of *Castilleja linariaefolia* pollen on seed set of *Ipomopsis aggregata*. *Canadian Journal of Botany*, v. 78, p. 600–606, 2000.
- CHUKR, N. S.; CAPELLARI, JR. L. IRIDACEAE. IN: WANDERLEY, M. G.; SHEPERD, G. J.; GIULIETTI, A. M.; MELHEM, T. S. *Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo*. FAPESC: RiMa, p.127-147, 2003.



- COCUCCI A. A.; VOGEL S. Oil-producing flowers of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in Southern South America. *Flora*, v. 196, p. 26-46, 2001.
- DAFNI, A.; EISIKOWITCH, D.; IVRI Y. Nectar flow and pollinators' efficiency in two co-occurring species of *Capparis* (Capparaceae) in Israel. *Plant Systematics and Evolution*, v. 157, p. 181-186, 1987.
- DAFNI, A.; KEVAN, P. G.; HUSBAND, B. C. *Practical pollination biology*. Cambridge: Environquest, 2005.
- FLANAGAN, R. J.; MITCHELL, R. J.; KNUTOWSKI, D.; KARRON J. D. Interspecific pollinator movements reduce pollen deposition and seed production in *Mimulus ringens* (Phrymaceae). *American Journal of Botany*, v. 96, n. 4, p. 809-815, 2009.
- JOHNSTON, I. M. The species of *Sisyrinchium* in Uruguay, Paraguai and Brasil. *Journal of The Arnold Arboretum*, v. 19, p. 376-401, 1938.
- KEVAN, P. G.; BAKER, H. G.. Insects as flowers visitors and pollinators. *Annual Review of Entomology*, v. 28, p. 407-453, 1983.
- LEVIN, D. A. The effect of corolla color and outline on interspecific pollen flow in *Phlox*. *Evolution*, v. 23, n. 3, p. 444-455, 1968.
- MCLERNON, S. M.; MURPHY, S. D.; AARSSSEN, L. W. Heterospecific pollen transfer between sympatric species in a midsuccessional old-field community. *American Journal of Botany*, v. 83, n. 9, p. 1168-1174, 1996.
- MORALES, C. L.; TRAVESET, A. Interspecific pollen transfer: magnitude, prevalence and consequences for plant fitness. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 27, n. 4, p. 221-238, 2008.
- MURCIA, C.; FEISINGER, P. Interspecific pollen loss by hummingbirds visiting flower mixtures: effects of floral architecture. *Ecology*, v. 77, n. 2, p. 550-560, 1996.
- NEFF, J. L.; SIMPSON, B. B. Oil-collecting structures in the Anthophoridae (Hymenoptera): morphology, function, and use in systematics. *Journal of Kansas Entomological Society*, v. 54, n. 1, p. 95-123, 1981.
- RAMÍREZ, N. Floral specialization and pollination: a quantitative analysis and comparison of the Leppik and the Faegri and van der Pijl Classification Systems. *Taxon*, v. 52, n. 4, p. 687-700, 2003.
- RATHCKE, B. Interactions for Pollination among Coflowering Shrubs. *Ecology*, v. 69, n. 2, p. 446-457, 1988.
- TRUYLIO, B.; HARTER-MARQUES, B.; ENGELS, W. Biologia floral e polinização de *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) na região do Planalto das Araucárias do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências*, v. 10, n. 1, p. 11-24, 2002.

VELOSO, H. P.; GÓES-FILHO, L. Fitogeografia brasileira: classificação fisionômico-ecológica da vegetação neotropical. Boletim Técnico do Projeto RADAMBRASIL, série Vegetação, v. 1, p.1-80, 1982.

YANG, C. F.; GITURU, R. W.; GUO, Y. H. Reproductive isolation of two sympatric louseworts, *Pedicularis rhinanthoides* and *Pedicularis longiflora* (Orobanchaceae): how does the same pollinator type avoid interspecific pollen transfer? Biological Journal of the Linnean Society, v. 90, p. 37-48, 2007.

WASER, N. M. Interspecific pollen transfer and competition between co-occurring plant species. Oecologia, v. 36, p. 223-236, 1978.



# Estudo preliminar da relação entre os visitantes florais e a disponibilidade de néctar em *Coccocypselum pulchellum* Cham. (Rubiaceae) na Floresta de Araucária, sul do Brasil

Caroline Scherer<sup>1</sup>  
Daniela Fuhro<sup>2</sup>  
Juliana Galaschi Teixeira<sup>3</sup>  
Nadilson Roberto Ferreira<sup>4</sup>

O néctar é o recurso floral mais frequente entre as angiospermas, sua secreção pode variar em função do local, do horário, da idade e do tamanho da flor e/ou função de condições ambientais externas (ENDRESS, 1994). Podem-se observar também duas estratégias de produção e secreção de néctar, a contínua e a limitada. Essas estratégias influenciam diretamente o comportamento e a diversidade da fauna associada às flores. Embora esse fato seja conhecido, poucos estudos têm investigado as mudanças em volume e concentração de néctar (DAFNI *et al.*, 2005; BERNARDINO *et al.*, 2010). Além disso, a disponibilidade e a distribuição desse recurso entre as flores e ao longo do dia podem influenciar o comportamento de polinizadores com respeito à frequência de visitas, ao número de flores visitadas e ao tempo de duração da visita (ROSA *et al.*, 2010).

Acredita-se que as características do néctar como volume, concentração e tipo de açúcares, bem como, concentração de outros constituintes possam estar associados ao tipo de polinizador ao qual a planta está adaptada, e que variações nessas características estão relacionadas às necessidades nutricionais e estruturas das partes bucais dos seus polinizadores (PROCTOR *et al.*, 1996).

A família Rubiaceae apresenta papel fundamental na estrutura de uma comunidade, além de ser fonte de recursos para os animais que se alimentam de pólen, néctar e frutos e, possuir um amplo espectro de polinizadores. No Brasil, os estudos da biologia reprodutiva de Rubiaceae abordam aspectos gerais da fenologia, morfologia floral, sistema reprodutivo

---

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas (cacabio@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul (dfuhro@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (julianagalaschi@gmail.com)

<sup>4</sup> Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (nr.ferreira@uol.com.br)

e interação com visitantes florais. Sendo que, a grande maioria desses trabalhos está concentrada na região Sudeste (SANTOS *et al.*, 2008), enquanto a região Sul apresenta carência nestes tipos de estudos.

Dentro da família Rubiaceae há alguns gêneros que apresentam heterostilia, como *Coccocypselum*, à semelhança de outros de famílias de angiospermas. A heterostilia é caracterizada como sendo um tipo de polimorfismo floral geneticamente controlado, interpretado como um mecanismo que dificulta a autopolinização e beneficia a polinização cruzada, principalmente pelas diferenças entre a morfologia floral quanto ao tamanho e estrutura dos grãos de pólen e papilas estigmáticas (BARRETT *et al.*, 2000). Neste contexto encontram-se indivíduos longistilos, que apresentam flores com estilete longo e estames curtos, e indivíduos brevistilos, com flores de estilete curto e estames longos.

O gênero *Coccocypselum* compreende cerca de 35 espécies distribuídas exclusivamente na região Neotropical. Apresenta ocorrência disjunta do México até a Colômbia, e nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil até a Argentina (COSTA; MAMEDE, 2002; CABRAL; SALAS, 2007). No Brasil, encontra-se a maior diversidade do gênero, com cerca de 21 espécies, notadamente na Mata Atlântica. As espécies de *Coccocypselum* são ervas anuais ou perenes, prostradas ou decumbentes, possuem estípulas interpeciolares, persistentes, com folhas opostas, pecioladas, caracteriza-se pelas cimeiras contraídas, flores distílicas, lilases, ovário bilocular, multiovulado e, usualmente, frutos carnosos azuis ou vináceos, às vezes tornando-se secos (COSTA; MAMEDE, 2002; CABRAL; SALAS, 2007).

A espécie em estudo, *Coccocypselum pulchellum* Cham. é uma erva rasteira, folhas com pecíolo delgado, lâminas ovadas a orbiculares, levemente cordiformes na base, herbáceas. As inflorescências são pedunculadas, corola pilosa na face exterior, lobos oval-triangulares, tubo alvo, fauce e lobos lilases. Estames inclusos (afixados no meio do tubo) nas flores longistilas, exsertos (afixados na fauce) nas flores brevistilas. Floresce desde outubro até janeiro, tendo o período predominante em dezembro. Frutos maduros de março em diante. A espécie se desenvolve nos campos, situados em solos úmidos até moderadamente friáveis, igualmente encontrada no interior e nas orlas dos sub-bosques dos pinhais (Floresta com Araucária), tornando-se frequente em caminhos e picadas de arrasto no interior das florestas (DELPRETE *et al.*, 2004; CABRAL; SALAS, 2007).

*Coccocypselum pulchellum* foi escolhida como objeto de trabalho devido aos seus recursos florais, suas características polimórficas e sua abundância na área de estudo, associadas às insuficientes investigações a respeito de sua biologia floral e de seus visitantes florais.

Assim, os objetivos desse estudo são (1) verificar a disponibilidade de néctar (volume e concentração) de *C. pulchellum*; (2) conhecer os visitantes florais da espécie; (3) averiguar as variações ambientais (umidade e temperatura); (4) relacionar a disponibilidade de néctar, os visitantes florais e as variações ambientais.

## Material e métodos

O estudo realizou-se em dezembro de 2010, a partir de uma atividade experimental no Curso Internacional de Campo sobre Ecologia da Polinização, no Centro de Pesquisa e Conservação da Natureza Pró-Mata/PUCRS (CPCN Pró-Mata), município de São Francisco de Paula, estado do Rio Grande do Sul (29°27'-29°35'S e 50°08'-50°15'W). A área total do CPCN Pró-Mata compreende aproximadamente 4.500ha e altitude entre 600 e 900 metros (BERTOLETTI; TEIXEIRA, 1995). A zona é caracterizada pelo encontro de três formações vegetais importantes: os Campos de Cima da Serra e a Floresta Ombrófila Mista ou Floresta com Araucária nas áreas de maior altitude e a Floresta Ombrófila Densa ou Mata Atlântica nas regiões de encosta (MARCHIORI, 2002). A Floresta com Araucária é caracterizada pela ocorrência de espécies relacionadas a diferentes contingentes fitogeográficos, com a presença mais antiga de espécies de origem austral-antártica e andina e o ingresso mais recente das espécies tropicais de origem atlântica e amazônica (RAMBO, 1950; BEHLING; PILAR, 2007). Portanto, reúne elementos florísticos de diferentes origens com atributos reprodutivos que foram selecionados em ambientes muito distintos, formando-se uma diversidade funcional peculiar. Apesar de a *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze ser a espécie arbórea fisionomicamente dominante, *Dicksonia sellowiana* Hook., *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl. e muitas outras espécies das famílias Myrtaceae, Solanaceae e Lauraceae compõem esta floresta. O clima é classificado como super-úmido a úmido, pois a região apresenta altos índices pluviométricos durante todo o ano, sendo a média anual de 2252mm (BACKES *et al.*, 2000). A temperatura média anual é de 14,5°C, com médias de temperaturas máximas e mínimas de 20,3°C e 9,9°C, respectivamente (IBGE, 1986; BERTOLETTI; TEIXEIRA, 1995).

A disponibilidade e concentração de néctar de *Coccocypselum pulchellum* foram realizadas em flores brevistiladas e longestiladas (morfotipos), ensacadas em pré-antese, adaptado de Galetto e Bernardello (2005). As medidas foram tomadas em cinco flores de cada morfotipo, a cada três horas, das 5 às 18h. O volume de néctar foi medido com uso de capilares e a concentração de açúcar com uso de refratômetro. A temperatura e umidade foram medidas com termômetro digital, concomitante à coleta do material em campo. Os procedimentos se deram em campo e laboratório, ao longo de dois dias.

Foram realizadas medidas morfológicas das flores longistiladas e brevistiladas: altura da corola, diâmetro da corola com o lábio, diâmetro da abertura, comprimento dos estames e comprimento do estilete + estigma. Estas medidas foram efetuadas considerando cinco flores de cada fase da antese para os dois morfotipos: Fase 1 (botões), Fase 2 (flores em início de antese), Fase 3 (flores abertas) e Fase 4 (flores maduras). Esse procedimento foi efetuado em laboratório, com auxílio de paquímetro com precisão de 0,5mm e lupa. A receptividade do estigma foi testada com peróxido de hidrogênio.

Para conhecer os visitantes florais foram realizadas observações diurnas (adaptado de DAFNI, 1992), ao longo de trajetos de aproximadamente 300m. Os visitantes florais

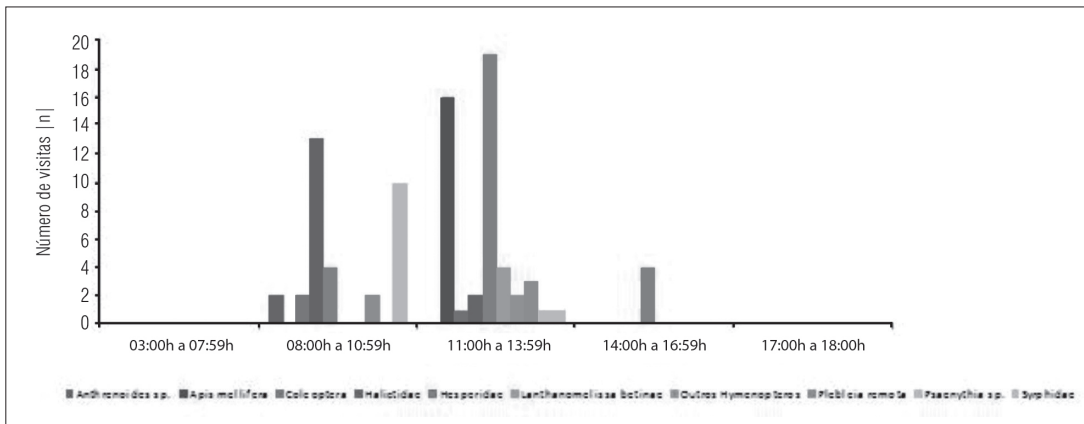
que pousavam na corola foram identificados a partir de fotografias e coletas de indivíduos com rede entomológica e/ou frasco mortífero contendo acetato de etila. Os insetos foram identificados pela pesquisadora Favízia Freitas de Oliveira e incluídos na coleção entomológica da UFBA. O comportamento dos visitantes florais foi descrito quanto ao morfotipo de flor (brevistilada ou longistilada), horário e número de visitas. As observações ocorreram das 7:30 às 18h, no decorrer de dois dias.

## Resultados e discussão

Foram identificados 10 visitantes florais para *Coccocypselum pulchellum*, distribuídos em quatro ordens: Coleoptera (identificado somente em nível de ordem), Diptera (Syrphidae), Hymenoptera (Andrenidae, Anthophoridae, Apidae e Halictidae) e Lepidoptera (Hesperidae).

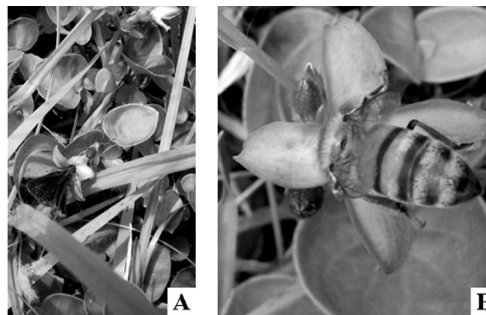
Coleoptera (três visitas/3%) buscou, aparentemente, pólen; Syrphidae (11 visitas/13%) forrageou néctar. Os himenópteros buscaram os dois recursos: néctar e pólen; *Anthrenoides* sp. (duas visitas/2%), *Apis mellifera* L., 1758 (16 visitas/19%), *Lanthanomelissa betinae* Urban, 1995 (quatro visitas/5%), *Plebeia remota* Holmberg, 1903 (cinco visitas/6%), *Psaenythia* sp. (uma visita/1%), Halictidae (15 visitas/17%) e outros himenópteros (duas visitas/2%). Hesperidae (27 visitas/32%) apresentou inserção de probóscide, coletando néctar. A quantidade de visitas dos táxons em relação às classes de horário é apresentada na Figura 1. Os dados mostram que Hesperidae foi o visitante mais frequente, seguido de *Apis mellifera* e de Halictidae (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3).

**Figura 1** - Quantidade de visitas de táxons identificados quanto aos horários de registro na área do Pró-Mata/PUCRS

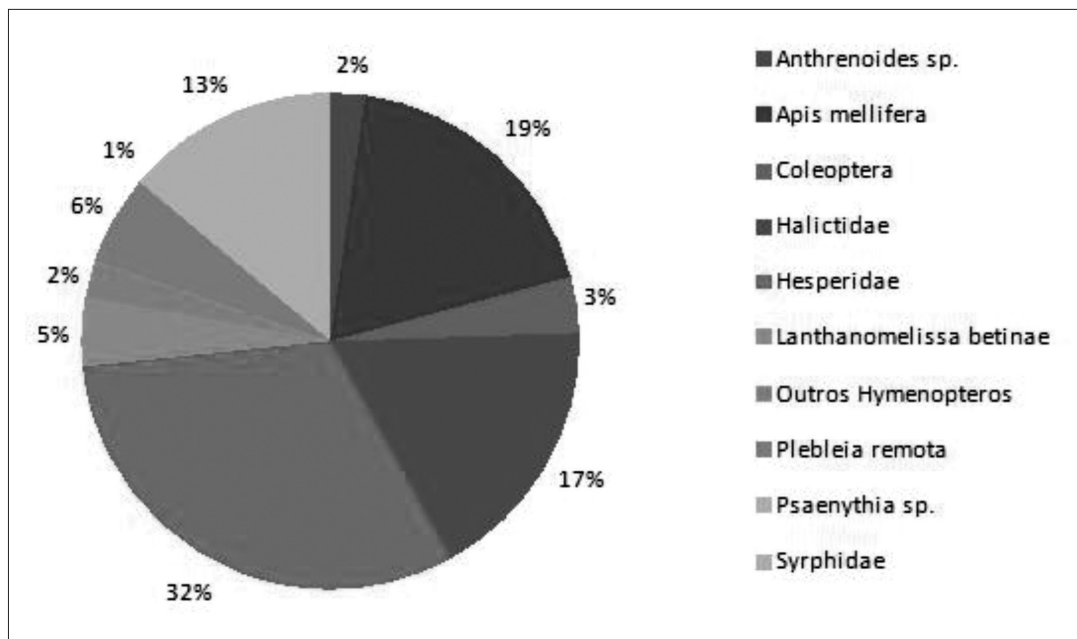


O panorama geral dos visitantes florais mostrou que todos efetuaram visitas efetivas, tanto em flores longistiladas como brevistiladas, com duração de visita entre dois e três minutos. Porém, para confirmação do comportamento de forrageio dos animais e elencar categorias, tais como polinizadores, pilhadores e/ou visitas de descanso ou dormitório e averiguar se há diferenciação na escolha entre flores longestiladas e brevistiladas, é necessário um período maior de observações em campo. A figura 3 representa o percentual dos táxons registrados durante esse estudo.

**Figura 2** - Hesperidae (A) e *Apis mellifera* (B) visitando flores de *Coccocypselum pulchellum* Cham. na área do Pró-Mata/PUCRS em dezembro de 2010



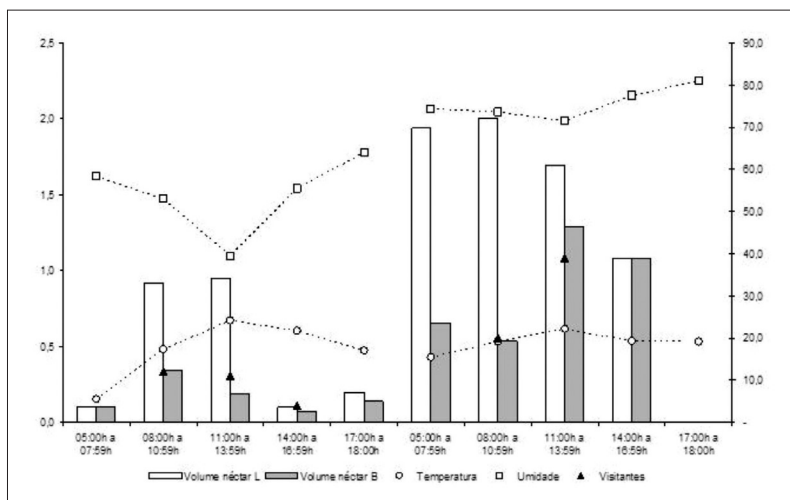
**Figura 3** - Representatividade percentual dos visitantes florais de *Coccocypselum pulchellum* Cham. registrados nos dias 01 e 02 de dezembro de 2010 no Pró-Mata/PUCRS



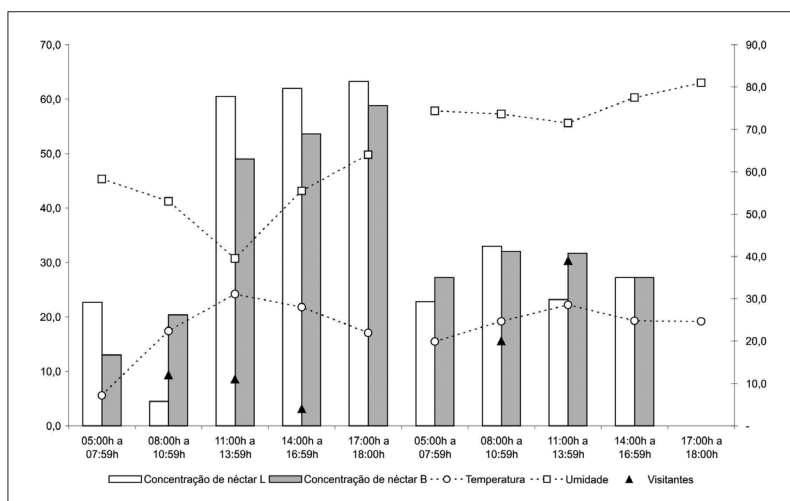
Os dados levantados não indicaram que os insetos procuram as flores de *C. pulchellum* no período de maior produção de néctar, conforme as Figuras 4 e 5. O intervalo entre as 11 e 14h mostra uma frequência de visitas mais acentuada no segundo dia de observação.



**Figura 4** - Variação temporal do volume de néctar em flores de *Coccocypselum pulchellum* Cham. longistiladas (L), brevistiladas (B), umidade, temperatura e número total de visitas efetuadas pelos insetos nos dias 01 e 02 de dezembro de 2010 no Pró-Mata/PUCRS.



**Figura 5** - Variação temporal da concentração de néctar em flores de *Coccocypselum pulchellum* Cham. longistiladas (L), brevistiladas (B), umidade, temperatura e número total de visitas efetuadas pelos insetos nos dias 01 e 02 de dezembro de 2010 no Pró-Mata/PUCRS.



Como se observa nas Figuras 4 e 5, a concentração de néctar é inversamente proporcional ao volume e várias hipóteses podem ser levantadas, entre elas, se todos os visitantes florais são consumidores de néctar ou pólen, ou se estariam naquele local forrageando por presas ou consumindo elementos florais. Desconhece-se o porquê de haver mais visitantes no segundo dia, porém poderia estar associado às condições climáticas ou a maior quantidade de alimento disponível nas flores amostrais. A concentração mostrou-se menor em umidade mais elevada, já que a temperatura não parece ter influenciado muito nessa variável, pois foi muito similar em ambos os dias.

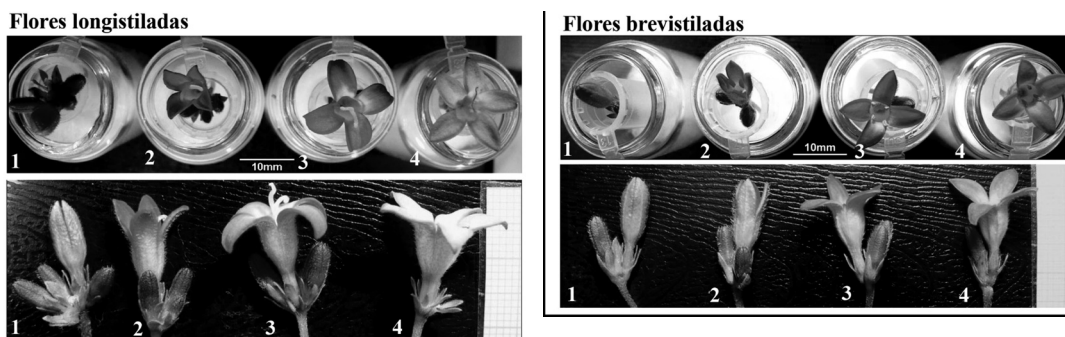
Neste estudo são apresentadas as médias morfométricas e a receptividade do estigma das flores longistiladas e brevistiladas (Tab. 1), nas diferentes fases (Fase 1 = botões, Fase 2 = flores em início de antese, Fase 3 = flores abertas e Fase 4 = flores maduras), (Fig. 6). Apesar de nossa busca na literatura publicada não encontramos estudos comparativos entre esses parâmetros e os resultados aqui apresentados.

**Tabela 1** - Médias morfométricas (mm) e a receptividade do estigma em flores longistiladas (L) e flores brevistiladas (B). Fase 1 = botões, Fase 2 = flores em início de antese, Fase 3 = flores abertas e Fase 4 = flores maduras

	Fase 1		Fase 2		Fase 3		Fase 4	
	L	B	L	B	L	B	L	B
Altura da corola	13,75	15,71	14,38	15,27	13,04	12,21	11,28	12,34
Diâmetro com lábio	4,66	3,67	11,45	4,75	15,41	15,35	14,89	16,55
Diâmetro da abertura	0	0	4,04	2,84	4,46	3,9	5,03	3,77
Comprimento dos estames	4,59	10,66	4,8	10,13	5,14	10,37	4,96	11,19
Compr. estilete + estigma	11,8	4,66	11,86	4,55	12,12	4,78	11,85	4,78
Receptividade do estigma	não	não	não	não	sim	sim	sim	sim

Os dados aqui apresentados, produtos de dois dias de campo, poderão ser complementados em futuros estudos que envolvam maior periodicidade e aprimoramento metodológico.

**Figura 6** - Vista geral das flores longistiladas e brevistiladas de *Coccocypselum pulchellum* Cham. e as diferentes fases da antese (1 = fase 1; 2 = fase 2; 3 = fase 3; 4 = fase 4)



## Agradecimentos

Agradecemos aos professores Blandina Felipe Viana e Leonardo Galetto pelas fundamentais orientações e precioso apoio desde o primeiro instante desse estudo. Ao professor Peter Kevan pelas importantes contribuições e pelo incentivo na continuidade desse estudo. À professora Favízia Freitas de Oliveira pela identificação dos táxa. A Jeison Scheunemann Carvalho pelo imprescindível auxílio na organização e análise dos dados

quantitativos. Ao biólogo Clóvis Bujes pela importante contribuição à interpretação dos dados qualitativos e quantitativos. À bióloga Letícia Azambuja pela monitoria durante o curso de polinização.

## Referências

- BACKES, A.; FERNANDES, A. V.; ZENI, D. J. Produção de folheto em uma floresta com *Araucaria angustifolia* no sul do Brasil. *Pesquisas (Botânica)*, v. 50, p. 97-117, 2000.
- BERNARDINO, A. S.; ALONSO, J. D. S.; GUEDES JR, V. L.; MAGALHÃES, T. L. Produção de néctar e visitantes florais de *Calliandra mucugeana* (Renvoize) (Fabaceae: Mimosoideae) em Campo Rupestre, Mucugê – BA. In: VIANA, B. F.; SILVA, F. O. *Biologia e ecologia da polinização*, Salvador: EDUFBA, 2010. (Série Cursos de campo, v. 2, p. 15-22)
- BARRETT, S. C. H.; WILKEN, D. H.; COLE, W. W. Heterostyly in the Lamiaceae: the case of *Salvia brandegeei*. *Plant Systematics and Evolution*, v. 223, p. 211-219, 2000.
- BEHLING, H.; PILLAR, V. D. Late Quaternary vegetation, biodiversity and fire dynamics on the Southern Brazilian highland and their implication for conservation and management of modern *Araucaria* forest and grassland ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences*, v. 362, p. 243-251, 2007.
- BERTOLETII, J. J.; TEIXEIRA, M. B. Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata. Termo de Referência. Museu de Ciências e Tecnologia, UBEA/PUCRS, v. 2, p. 1-47, 1995.
- CABRAL, E. L.; SALAS, R. M. *Coccocypselum pulchellum* (Rubiaceae), nuevo registro para Argentina. *Darwiniana*, v. 45, n. 2, p. 181-187, 2007.
- COSTA, C. B.; MAMEDE, M. C. H. Sinopse do Gênero *Coccocypselum* P. Browne (Rubiaceae) no estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, v. 2, n. 1, 2002. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v2n1/pt/abstract?article+BN01402012002>>. Acesso em: 12 jan. 2010.
- DAFNI, A. *Pollination ecology: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 1992.
- DAFNI, A.; KEVAN, P. G.; HUSBAND, B. C. *Practical pollination biology*. Cambridge: Environquest Ltd, p. 590, 2005.
- DELPRETE, P. G.; SMITH, L. B.; KLEIN, R. M. Rubiáceas. Vol. I – Gêneros de A-G: 1. *Alseis* até 19. *Galium*. Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 2004.
- ENDRESS, P. K. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge: Cambridge University Press, 499p. 1994.
- GALETTO, L.; BERNARDELLO, G. Nectar. In: DAFNI, A.; KEVAN, P. G.; HUSBAND, B. C. *Practical pollination biology*. Cambridge: Environquest, Ltd., 2005.

IBGE. *Levantamento de Recursos Naturais*. Rio de Janeiro: IBGE, 1986. v. 33.

MARCHIORI, J. N. C. *Fitogeografia do Rio Grande do Sul: Enfoque Histórico e Sistemas de Classificação*. Porto Alegre: EST Edições, 2002.

PROCTOR, M.; YEO, P.; LACK, A. *The natural history of pollination*. Portland: Oregon Timber Press, 1996.

RAMBO, B. A porta de Torres: estudo fitogeográfico. *An. Bot. HBR*, v. 2, p. 125-136, 1950.

ROSA, J. F.; OLIVEIRA, J. P. L.; ALVES, E.; ORTIZ, C. D. M. Avaliação da produção de néctar de *Caesalpinia ferrea* (Mart.) (Fabaceae: Papilionoideae) e sua relação com os visitantes florais (legítimos e roubadores) em Limoeiro do Norte-Ceará-Brasil. In.: VIANA, B. F.; SILVA, F. O. *Biologia e ecologia da polinização*. Salvador: EDUFBA, 2010. (Série Cursos de campo, v. 2, p. 147-163)

SANTOS, O. A.; WEBBER, A. C.; COSTA, F. R. C. Biologia reprodutiva de *Psychotria spectabilis* Steyrm. e *Palicourea* cf. *virens* (Poepp & Endl.) Standl. (Rubiaceae) em uma floresta tropical úmida na região de Manaus, AM, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 22, n. 1, p. 275-285, 2008.



# The efficiency of pollen transfer by three species of stingless bees (*Melipona quadrifasciata* L., 1836; *Melipona bicolor* L., 1836 and *Melipona marginata* L., 1836) during the pollination of *Solanum variable*

Camila Maia-Silva<sup>1</sup>

Gail MacInnis<sup>2</sup>

Carina de Oliveira-Abreu<sup>3</sup>

Mikail Olinda de Oliveira<sup>4</sup>

Patrícia Nunes-Silva<sup>5</sup>

Most angiosperms have longitudinally dehiscing anthers. Only 6 to 8% of the species have poricidal dehiscing anthers (BUCHMANN; HURLEY, 1978; NUNES-SILVA *et al.*, 2010). In this type of dehiscence, the pollen is liberated from the anthers through apical pores (BUCHMANN, 1983). In the Araucaria forest region of Rio Grande do Sul, Brazil, 10% of melittophily plants have flowers with poricidal anthers (HARTER *et al.*, 2002), most of them belong to the families Melastomataceae and Solanaceae. The Solanaceae family has over 2500 species grouped in approximately 90 genera, occurring in a large range of habitats. The fruit of several species are globally important as crops such as tomato and potato (SMITH; KNAPP, 2002).

Bees of families Andrenidae, Apidae (except *Apis* and some species from *Trigona* group), Colletidae, Halictidae and Megachilidae are capable of pollinating the flowers with poricidal anthers (MICHENER, 1962; WILLE, 1963; BUCHMANN; HURLEY, 1978; HARTER *et al.*, 2002, NUNES-SILVA *et al.*, 2010) due to the fact that these bees generate can vibrate they flight muscles to shake the anthers and cause pollen release. This type of pollination is known as “buzz” or “buzz pollination”. When visiting a flower, a bee grasps the cone of tubular anthers with the front pairs of legs, wraps the abdomen around the apical pores of the anthers, and vibrates the anthers by rapidly contracting the indirect flight muscles

---

<sup>1</sup> University of São Paulo (camilamaia@usp.br)

<sup>2</sup> Concordia University (g\_maci@live.concordia.ca)

<sup>3</sup> Federal University of Ceará (carina.abreu10@gmail.com)

<sup>4</sup> Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (pns\_bio@yahoo.com.br)

<sup>5</sup> Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (pns\_bio@yahoo.com.br)

(MICHENER, 1962; BUCHMANN; HURLEY, 1978). This causes pollen to burst out of the anther and land on the abdomen of the bee.

Although the mechanism of buzz pollination in *Solanaceae* has been well characterized (MICHENER, 1962; BUCHMANN, 1983), detailed studies which identify both the buzz-pollinated plant species and their pollinators are few (SMITH; KNAPP, 2002).

As presumed by information presented in specialized literature that larger species of bees (larger flight muscles) are able to liberate more pollen, and consequently are more efficient in pollinating these plants. In the present paper was studied the relationship between the physical characteristics of the visiting pollinators of one particular species, *Solanum variable* Mart. (*Solanaceae*), and the pollination intensity and pollination efficiency.

## Methods

### *Study Site*

The Pró-Mata is a protected area with about 5000 ha, inserted in Araucaria rainforest domain. The vegetation consists of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) and secondary forest, with the rainforest being surrounded by open grassland. This area is located on the Serra Geral in municipality of São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brazil, at 29°S and 51°W with altitude ranging from 600 to 1000 m (HARTER *et al.*, 2002).

### *Bees and Plant Species Investigated*

In Pró-Mata there are at least 19 species with poricidal anthers of the families Melastomataceae and Solanaceae (HARTER *et al.*, 2002) and the species of the genus *Melipona* (Apidae, Meliponini) are abundant at the study site, principally *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* L., 1836, *Melipona bicolor schencki* L., 1836 and *Melipona marginata obscurior* L., 1836.

The pollination intensity (PI) being the amount of conspecific pollen deposited onto individual stigmas, and pollination efficiency being the average of PI from activity of a given pollinator population (VASSIERE, 1991; DAFNI *et al.*, 2005).

**Figure 1** - Three species of *Melipona* a) *Melipona marginata obscurior*, b) *Melipona bicolor schencki*, c) *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*, known pollinators of *Solanum variable*



It was examined the pre-fruit stages of development of *Solanum variable* Mart., specifically focusing on the pollination processes (pollination intensity and pollination efficiency) and efficiency of three of the flower's associated pollinators: *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*, *Melipona bicolor schencki* and *Melipona marginata obscurior*. These species differ significantly in body size (Fig. 1). Typical anatomical measurements of these three species are listed in Table 1.

**Table 1** - Measurements of the physical characteristics of the three study species (SCHWARZ, 1932)

	M. quadrifasciata	M. bicolor	M. marginata
Length (mm)	8 - 10.5	8.5 - 10	6 - 7
Thorax width (mm)	3.75 - 4.75	3.75 - 4	2.5 - 3
Length forewing (mm)	7 - 10.5	7.5 - 8	5.7 - 5.6

The bees were identified by Favízia Freitas de Oliveira from Universidade Federal da Bahia, and deposited at the entomological collection of the same University.

### *Floral biology*

Five unopened flower buds from five different trees of *Solanum variable* were covered with voil pollination bags and were observed to determine the time of opening. Another five flowers from different trees were covered with voil pollination bags and were checked hourly between 6:00am and 5:00pm, to investigate at what time of the day the stigmas become receptive. Stigma receptivity was then determined using the peroxide test as outlined by Dafni *et al.*, (2005). In addition, was verified the porus opening status of another five flowers from different trees.

Nine flowers and nine fruits were collected at random to determine the number of ovules per flower and seeds per fruit. These samples were dissected and the number of ovules and seeds were counted and recorded to later compare the ovule to seed ratio.

### *Wind Pollination Test*

Twenty flowers from ten different trees of *Solanum variable* were covered with mesh voil pollination bags to evaluate the effect of wind pollination (anemophily). One day after opening of the buds, the flowers were taken to the laboratory, and the numbers of grains on the stigma were counted. If pollen grains are found on the stigma, wind pollination was considered possible. Furthermore, restricting access to biotic pollinators can also indicate whether self-pollination is possible.

### *Natural Pollination Test*

Twenty flower buds in pre-anthesis from ten different trees of *Solanum variable* were marked in order to evaluate aspects of natural unrestricted pollination. After anthesis, ten



buds were collected after an exposition period of 24h and another ten buds after 36h of exposition. Since these flowers had not been covered with pollination bags, floral visitors were able to collect pollen without any restriction.

One and two days, respectively, after the opening of the buds, the flowers were taken to the laboratory and the stigmas were prepared according to the protocols outlined by Dafni *et al.*, (2005). The pollen grains on each stigma were dyed with a gelatin-fuchsin solution and counted under a microscope.

### *Bee Pollination Test*

A large number of flower buds were bagged for the bee pollination test. In order to evaluate the effect of bee pollination, the flower buds were covered with bags until flower opening. As soon as the flowers opened, the pollination bag was removed until a single bee visited the flower. For each bee-visit, the date and time of the visit, the duration of the visit, and the bee species were recorded. After the visit, the flowers were covered again, in order to ensure the pollen grains were well adhered to the stigmas. On the day after the visit, the flowers were taken to the laboratory, stigmas were again prepared according to the Dafni *et al.*, (2005) protocol and the number of grains on each stigma was counted under a microscope.

### *Data Analyses*

We used the test Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks to compare: the duration of bee visits on *Solanum variable* flowers; the number of pollen grains on the stigma of *Solanum variable* flowers after a single bee visit and the percentage of pollen grains from *Solanum variable* on the ventral region of thorax and abdomen of bees. We used Spearman Rank Correlation to test the relationships between duration of the single bee-visits and number of pollen grains on the stigma. The analyses were done using the software Sigma Stat, 3.8 and the plots with Sigma Plot, 10.0.

## **Results**

### *Floral biology*

It was observed that the anthesis of *Solanum variable* flowers initiated in the first hours of the day yet anthesis can occur during the entire day. The stigmas were receptive during the entire observation period (from 6:00 am to 5:00 pm), and the pores of the anthers (poricidal anthers) opened around 8:00 am. For the naturally pollinated, randomly selected specimens, the number of seeds produced is virtually the same as the number of ovules per flower, as would be expected, see Table 2.

**Table 2** - Number of seeds per fruit and ovules per flower of *Solanum variable*. Given are the mean number of seeds, ovules, and the number of fruit/flowers examined (N)

	Seeds	Ovules
Mean $\pm$ SD	42 $\pm$ 5.8	42 $\pm$ 9.3
N	9	9

### Wind Pollination Test

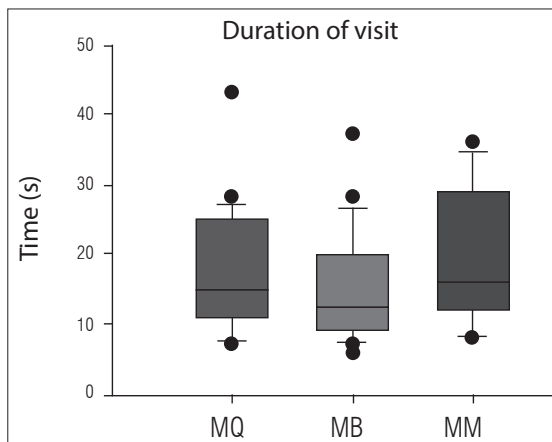
After the flowers had been bagged for 24 hours, nine of the ten flowers were analyzed for the presence pollen grains. The mean number of *Solanum* pollen grains found per stigma was  $2 \pm 2.2$ . The majority of the pollen grains found on the stigmas were from grasses and other anemophilous species, suggesting that wind pollination is not possible.

### Natural Pollination Test

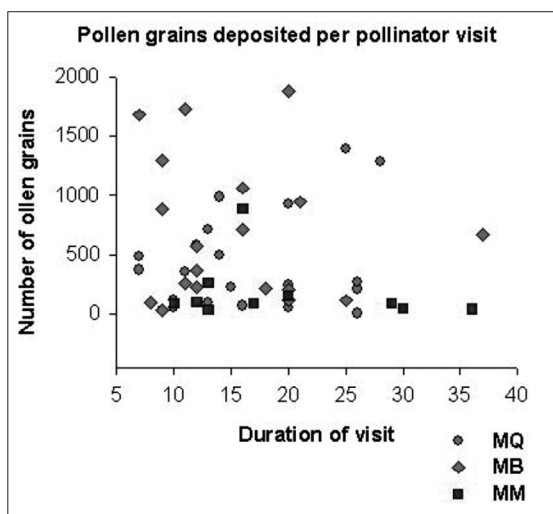
The numbers of pollen grains in the unrestricted pollination group were counted after 24 and 36 hours of exposure. The mean number of grains after 24 hours was  $756 \pm 453.3$ , and  $625 \pm 334.1$  after 36 hours comprising that pollination intensity did not increase with exposure time.

### Bee Pollination Test

The duration of visits varied from 6 to 36 seconds, with *Melipona quadrifasciata* averaging 18 seconds, *Melipona bicolor* averaging 15 seconds and *Melipona marginata* averaging about 19 seconds (Fig. 2). The duration of visit had no significant relationship to the number of grains deposited as showed in Figure 3.



**Figure 2** - Duration of bee visits on *Solanum variable* flowers (MQ: *Melipona quadrifasciata*, MB: *Melipona bicolor* and MM: *Melipona marginata*). Visit times did not differ statistically between bee species (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks:  $P > 0.05$ )

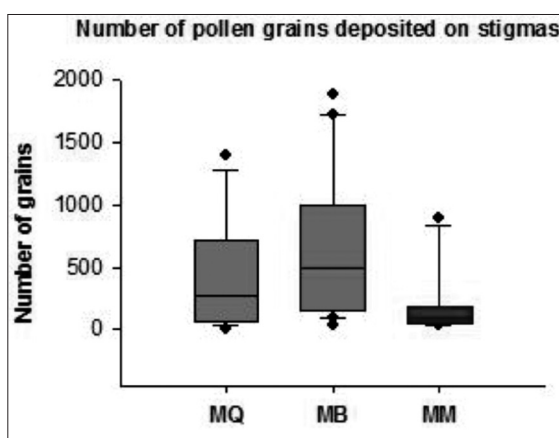


**Figure 3** - Duration of the single bee-visits vs. number of pollen grains on the stigma, where MQ: *Melipona quadrifasciata*, MB: *Melipona bicolor* and MM: *Melipona marginata*. There were no significant relationships between duration of visit and number of pollen grains on the stigmas (Spearman Rank Correlation;  $P > 0.05$ )

The number of pollen grains deposited varied greatly for one visit by each species. The only statistically significant relationship was found to be between that of *Melipona bicolor* and *Melipona marginata*, see Figure 4. The average number of grains deposited by each *Melipona* is listed in Table 3.

**Table 3** - Number of pollen grains on the stigma of *Solanum variable* flowers after a single bee visit (MQ: *Melipona quadrifasciata*, MB: *Melipona bicolor* and MM: *Melipona marginata*). Given are the mean number of pollen grains and the number of flowers examined (N)

	Species		
	MQ	MB	MM
Mean $\pm$ SD	442 $\pm$ 430	650 $\pm$ 586	182 $\pm$ 259
N	19	21	10



**Figure 4** - Number of pollen grains on the stigma of *Solanum variable* flowers after a single bee visit (MQ: *Melipona quadrifasciata*, MB: *Melipona bicolor* and MM: *Melipona marginata*). There was found to be statistically significant difference between *Melipona bicolor* and *Melipona marginata* (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks;  $P < 0,05$ )

## Single Bee Visits vs. Natural Pollination

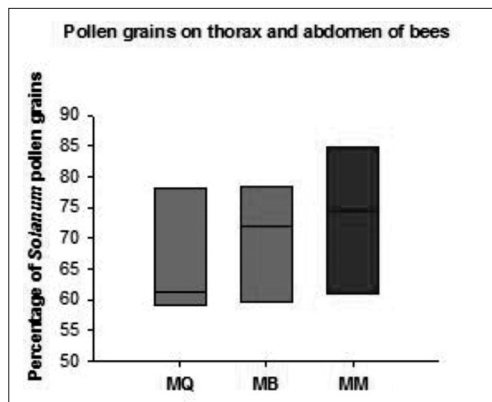
Comparing the natural pollination groups with the experimental group (single bee visits). The natural pollination results in more pollen per stigma in almost every case (see Tab. 4), but there was no significant statistical relationship found between natural pollination and the single-visit controlled pollination experiments (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks,  $P > 0.05$ ).

**Table 4** - Comparison between natural pollination and single bee visits of *Solanum variable* flowers. Given are the mean number of pollen grains per stigma and number of flowers examined (n); NP: Natural pollination; MQ: *Melipona quadrifasciata*; MB: *Melipona bicolor*; MM: *Melipona marginata*

	NP 24hr	NP 36hr	MQ 1visit	MB 1visit	MM 1visit
Mean	756	625	442	650	182
± SD	±453	±334	±430	±586	±259
n	10	8	19	21	10

## Percentage of pollen on bees

As suggested by behavior of bees on flowers and the kind of the anther of the Solanaceae, the number of *Solanum variable* pollen grains on the actual bodies of the bees were mainly located on the ventral side of the thorax and abdomen. The grains were counted under a microscope and it was determined that there was no statistical relationship found between the size of the bees and the percentage of *Solanum* pollen remaining on the body of the bees (See Tab. 5 and Fig. 5).



**Figure 5** - Percentage of pollen grains from *Solanum variable* on the ventral region of thorax and abdomen of bees (MQ: *Melipona quadrifasciata*, MB: *Melipona bicolor* and MM: *Melipona marginata*). The central line of the boxes, limited by the 1st (lower limit) and 3rd quartiles (upper limit), indicates the median value of the data. There were no significant relationships between bee species (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks,  $P > 0.05$ )

**Table 5** - Percentage mean of pollen grains from *Solanum variable* flowers on the ventral region of thorax and abdomen of bees (MQ: *Melipona quadrifasciata*, MB: *Melipona bicolor* and MM: *Melipona marginata*). Given are the mean number of pollen grains per stigma and number of bees examined (n)

	Species		
	MQ	MB	MM
Mean $\pm$ SD	67 $\pm$ 10.4	70 $\pm$ 9.6	73 $\pm$ 12.4
N	5	8	3

## Discussion

Wind or self pollination is not possible for *Solanum variable*. There were virtually no *Solanum* pollen grains found on the stigmas of the flowers which were restricted to all pollination vectors except wind. Buzz pollination is a necessary component to the reproductive cycle of this species of *Solanum*. The floral characteristics of *Solanum variable* are typical for melittophily flowers (FAEGRI; VAN DER PIJL, 1979) pollinated through buzz-pollination (BUCHMANN, 1983). These characteristics are: ornamented corolla with visible pattern, visible stamens, poricidal anthers convergent around the style as well as small and light pollen grains that are liberated from the anthers through mechanical vibration.

Each species of *Melipona* studied, was more than capable of depositing enough pollen to fertilize each ovule. However, it was found that the size of the bee did not have a significant impact on the number of pollen grains deposited on the stigma of the flowers. The only statistically significant difference was in the pollen deposited by *Melipona bicolor* and *Melipona marginata*. However this significance cannot be due to the size of the bees because there was no significant difference found between the amount of pollen deposited by *M. marginata* and *M. quadrifasciata*, and *M. quadrifasciata* is larger than both *M. marginata* and *M. Bicolor*. The duration of the visit was also found to have no correlation with the amount of pollen deposited onto the stigma. The amount of pollen on the stigmas seemed to have maximum holding point, where the stigmas become saturated and can hold no more pollen, regardless of the duration of the visit and size of the visitor. The amount of pollen found on the stigma never exceeded 2000 grains per stigma.

There was also no correlation between the amount of pollen on the stigmas of the unrestricted, naturally pollinated samples, and the single visit samples. A single visit was sufficient enough to transfer the required number of grains to fertilize all ovules. This eludes again back to the fact that the stigmas become saturated and no more pollen is able to be deposited, regardless of the frequency of pollinators.

In a study about the vibratory capacity of stingless bees, Nunes-Silva *et al.*, (2008) showed that the thoracic vibrations (main frequency, velocity amplitude) of seven species are similar despite differences in body size between the species. This finding suggests similar pollination capacity of these bee species. It is therefore possible that the small bees are just as efficient in buzz pollination as the larger bees.

In conclusion, each of the three species of *Melipona* studied was an efficient pollinator of *Solanum variable*. Regardless of the size of the bee, there is no significant difference on the amount of pollen deposited on the stigmas. The flight muscles of the smaller *Melipona* were just as capable of liberating enough pollen to successfully pollinate *Solanum variable* as the larger *Melipona*.

## Acknowledgements

We would like to thank everyone at the Center for Research and Nature Conservation Pró-Mata, in São Francisco de Paula, Brazil for all their help and equipment, and we also want to thank B. Blochtein, S. Lodi, P. Kevan, B.F. Viana, B. Freitas, F.F. Oliveira, L. Galetto, and all the monitors of the field course for all their guidance and assistance in this project.

## References

BUCHMANN, S. L.; HURLEY, J. P. A biophysical model for buzz pollination in angiosperms. *Journal of Theoretical Biology*, v. 72, p. 639–657, 1978.

DAFNI, A.; KEVAN, P. G.; HUSBAND, B. C. Practical pollination biology. Cambridge: Environquest, p. 590, 2005.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. *The Principles of Pollination Ecology*. Oxford: Pergamon Press, 1979. p. 244,

HARTER, B., LEISTIKOW, C., WILMS, W., TRUYLIO, B.; ENGELS, W. Bees collecting pollen from flowers with poricidal anthers in a south Brazilian *Araucaria* forest: a community study. *Journal of Apicultural Research*, v. 40, p. 9-16, 2002.

SCHWARZ, H. F. The genus *Melipona* - the type genus of the Meliponidae or stingless bees. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 63, p. 231-460, 1932.

SMITH, S. D.; KNAPP, S. The natural history of reproduction in *Solanum* and *Lycianthes* (Solanaceae) in a subtropical moist forest. *Bulletin of the Natural History Museum: Botany Series*, v. 32, p. 125-136, 2002.

MICHENER, C. D. An interesting method of pollen collecting by bees from flowers with tubular anthers. *Revista de Biologia Tropical*, v. 10, p. 167-175, 1962.

NUNES-SILVA, P.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A polinização por vibração. *Oecologia Australis*, v. 14, p. 140-151, 2010.

NUNES-SILVA, P.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Thoracic vibrations in stingless bees: is body size important for an efficient buzz pollination? In: XXIII International Congress of Entomology. 2008, Durban, Anais do XXIII International Congress of Entomology. Durban, p. 2440, 2008.

VASSIERE, B. E. Honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), as pollinators of upland cotton, *Gossypium* L. (Malvaceae), for hybrid seed production. Tese (Doutorado, Texas A&M University, College Station), Texas. 1991.

WILLE, A. Behavioral adaptations of bees for pollen collecting from *Cassia* flowers. *Revista de Biologia Tropical*, v. 11, p. 205-210, 1963.

# Biologia floral de *Lupinus* sp. (Fabaceae) e espectro de visitantes, com ênfase em *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) nos campos de altitude no sul do Brasil

Rosana Halinski de Oliveira<sup>1</sup>  
Liedson Tavares Carneiro<sup>2</sup>  
Jussara Fernanda Santos<sup>3</sup>  
Daniela Loose Ferreira<sup>4</sup>

A polinização é um processo mutualístico em que a planta depende de um vetor para o transporte de pólen e deposição em estigmas receptivos, e em contrapartida recursos são ofertados aos polinizadores (BAWA, 1990). Em espécies entomófilas, as plantas necessitam indicar ao visitante floral onde se encontram os recursos florais para que esse processo aconteça. Essas indicações produzidas pelas plantas podem ser, por exemplo, guias de néctar (WASER; PRICE, 1985), osmóforos (VOGEL, 1990) ou mudança na coloração das flores (WEISS, 1992). Por outro lado, estratégias em nível populacional são necessárias para que as flores sejam descobertas e exploradas pelos visitantes florais. A concentração de indivíduos em manchas densas tem sido apontada como uma estratégia para maximizar a atratividade floral, aumentando a taxa de visitação e, conseqüentemente, a eficiência na polinização (SIH; BALTUS, 1987; GRINDELAND *et al.*, 2005). Em resposta, os visitantes florais tendem a maximizar a aquisição de recursos, explorando onde há maior atratividade floral assumindo assim modelos de forrageio ótimo (PYKE, 1979).

A espécie *Apis mellifera* Linnaeus 1758, visitante floral e polinizadora de inúmeras espécies de plantas, tem sido avaliada quanto às estratégias de aquisição de recursos e ao padrão de forrageio de acordo com quantidade, qualidade e disponibilidade dos mesmos (GREGGERS; MENZEL, 1993). Os principais recursos explorados por esta abelha em suas visitas às flores são o pólen e o néctar, e seu comportamento na visita muda em relação às plantas visitadas e ao recurso coletado (AGOSTINI; SAZIMA, 2006).

O gênero *Lupinus* L. (Fabaceae) é bem conhecido quanto as suas estratégias de mudança de coloração das flores como maximização da atratividade floral (GORI, 1989;

---

<sup>1</sup> Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (rosana.oliveira@puccrs.br)

<sup>2</sup> Universidade Federal da Paraíba (liedson.tavares@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de São Carlos (jussaraflo@yahoo.com.br)

<sup>4</sup> Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (daniloose@gmail.com)



STEAD; REID, 1990; NE'EMAN; NESHER, 1995; NUTTMAN; WILLMER, 2003). *Lupinus*, conhecido popularmente como tremoço (BACKES, 1999), é constituído por plantas anuais herbáceas e arbustivas que se distribuem por ampla variação climática (CHRISTOFOLINI, 1989; GLADSTONE, 1998). No novo mundo, as espécies deste gênero estão distribuídas na América do Norte, México, Peru, Brasil, Uruguai e Argentina (CHRISTOFOLINI, 1989). No Brasil são encontradas em solos rupestres e em Cerrados (MONTEIRO; MONTEIRO, 1986) e nos Campos Sulinos colonizando áreas abertas como taludes de estradas e voçorocas (PINHEIRO; MIOTTO, 2001). Quando presentes em florestas, os indivíduos crescem em clareiras como plantas pioneiras em solos recentemente perturbados (GLADSTONE, 1998).

Pinheiro e Miotto (2001) identificaram 13 espécies de *Lupinus* distribuídas no Rio Grande do Sul, principalmente na região nordeste do Estado, nos Campos de Cima da Serra, onde o período de floração e frutificação ocorre de outubro a janeiro. No entanto, as espécies presentes em Florestas de Araucária no sul do Brasil foram pouco estudadas em nível de polinização. Portanto, este trabalho tem como objetivos (1) descrever a biologia floral de *Lupinus* sp., (2) avaliar a concentração de néctar das flores; (3) identificar os visitantes florais; (4) observar o comportamento de forrageio de *A. mellifera* em flores e (5) relacionar a taxa de visitação de insetos à variação na densidade de flores de manchas.

## Metodologia

### *Área de estudo*

O estudo foi conduzido no período de 30 de novembro a 02 de dezembro de 2010, no Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata, no município de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul (29°27'S e 50°08'O). A região é constituída de Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista e Campos. O clima na área é classificado como super-úmido a úmido (BERTOLETTI; TEIXEIRA, 1995).

### *Coleta de dados*

Para este estudo, dez manchas de flores de *Lupinus* sp. foram demarcadas e numeradas. Cada mancha teve sua densidade quantificada através do número de inflorescências (Tab. 1) e a atratividade floral avaliada a partir da taxa de visitação de abelhas nos dias 01 e 02 de dezembro de 2010.

**Tabela 1** - Número de inflorescências em cada mancha (n=10) no Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza – Pró-Mata, São Francisco de Paula, RS, Brasil

Mancha	Nº de inflorescências
1	12
2	12
3	15
4	66
5	6
6	32
7	50
8	23
9	284
10	14

### *Biologia floral*

Aspectos da morfologia e biologia floral de *Lupinus* sp. foram descritos e associados ao comportamento de forrageio dos visitantes florais. Dessa forma, as flores foram avaliadas nas diferentes fases da antese quanto à coloração da corola, morfologia dos estames, liberação de grãos de pólen e receptividade estigmática. Além disso, foi verificado o comprimento das flores (n=18) no início de antese, medindo-se da base do cálice até o ápice das quilhas. A duração da antese de *Lupinus* sp. foi estimada por três dias, a partir de 10 botões florais em pré-antese marcados com barbante e escolhidos aleatoriamente nas manchas.

Para verificar a receptividade estigmática e o aspecto das anteras ao longo do dia, foram marcadas 18 flores em início de antese, sendo analisadas três flores a cada duas horas entre às 8h e 18h. A receptividade estigmática foi avaliada ao se inserir o estigma das flores em peróxido de hidrogênio (DAFNI *et al.*, 2005).

O néctar foi coletado em campo com o auxílio de capilares (DAFNI *et al.*, 2005) e a concentração de açúcares foi mensurada com refratômetro manual marca Brix (0-32%). As coletas de néctar nas flores das manchas estudadas foram realizadas em quatro horários ao longo do dia (9h, 11h30min, 14h e 16h30min). Com o intuito de minimizar a influencia na taxa de visitação, foram utilizadas 10% das inflorescências presentes em cada mancha. Inflorescências ensacadas serviram como controle, para se obter a concentração do néctar sem visitação. Em todas as medições, nos mesmos horários, foram utilizadas três flores recém-abertas, três flores parcialmente abertas e três flores abertas em cada inflorescência, totalizando nove flores/ inflorescência.

### *Visitantes florais*

A taxa de visitação de insetos em flores de *Lupinus* sp. foi amostrada ao longo de um dia, através do monitoramento de insetos em 5 manchas por observador. O número de visitas em cada mancha foi registrado durante 10 minutos em seis horários (8h, 10h, 12h, 14h, 16h e 18h), totalizando um esforço amostral de 10h.

Devido sua maior frequência como visitante floral de *Lupinus* sp., analisou-se o comportamento de forrageio de 10 indivíduos de *A. mellifera*, através de observações diretas e com o auxílio de câmera fotográfica. Desse modo, o comportamento de forrageio das abelhas foi avaliado quanto aos recursos coletados (pólen ou néctar), fases da antese das flores visitadas (corola clara/ escura) e padrão de forrageio.

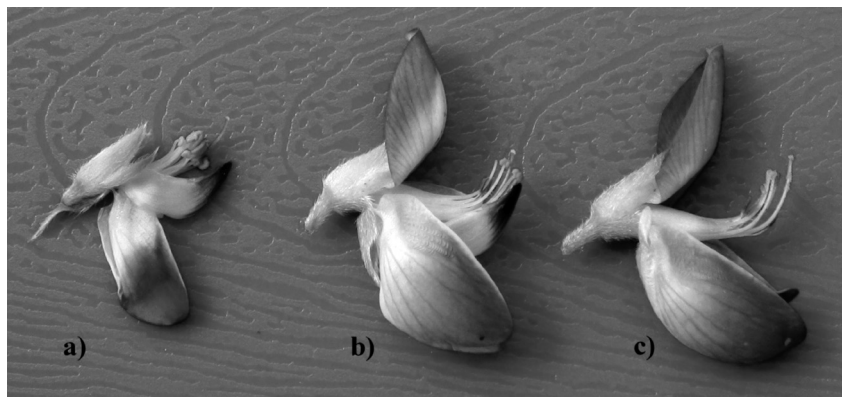
## Resultados

### *Biologia floral*

Os indivíduos de *Lupinus* sp. apresentam inflorescências (tipo racemo) compostas por flores hermafroditas de 14,61mm ( $n= 18 \pm 0,65$ ) de comprimento. Suas estruturas reprodutivas e recursos florais se encontram envoltos pela corola, de modo a restringir o acesso pelo visitante floral.

Nas inflorescências de *Lupinus* sp., houve mudança na coloração da corola, principalmente na pétala estandarte. As flores apicais possuem coloração rosa claro enquanto que as flores basais adquirem um tom mais escuro (Fig. 1).

**Figura 1** - Flores de *Lupinus* sp.. a) Botão floral (aberto manualmente) com estames de anteras longas maiores que os de anteras curtas. b) Flor em início de antese, com estandarte de coloração clara e estames de anteras longas senescentes. c) Flor em final de antese, com estandarte com coloração mais escura e grãos de pólen liberados de estames de anteras curtas



As flores possuem 10 estames monadelfos, unidos na base e livres no ápice, formando um tubo estaminal. Estames de dois tipos se diferenciam pelo tamanho e formato das anteras. No botão floral, os estames de anteras curtas são menores que os de antera longa. Ao longo da antese, os estames de anteras longas liberam os grãos de pólen e diminuem de tamanho, enquanto os estames de anteras curtas crescem, ocorrendo uma segunda fase de disponibilidade polínica (Fig. 1). Os estigmas das flores testadas se encontravam receptivos ao longo de todo o período de acompanhamento, até o terceiro dia de antese.

A concentração média de açúcares no néctar de flores de *Lupinus* sp. (n= 42) na maioria das manchas e nas inflorescências ensacadas (controle) foi de 9%, nos quatro horários amostrados ao longo do dia. No entanto entre as manchas analisadas houve uma variação entre 7,5% (manchas 3 e 5) e 11% (mancha 2) na concentração de açúcares no néctar.

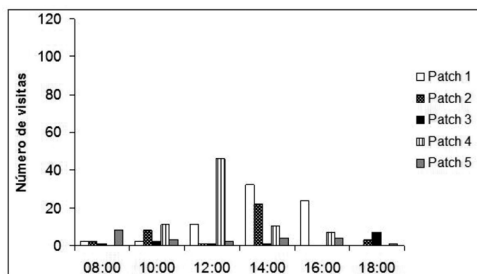
### Visitantes florais

Dentre os visitantes florais de *Lupinus* sp., observou-se 845 insetos, distribuídos nas seguintes famílias: Crysomelidae, Formicidae, Vespidae e Apidae. *A. mellifera* foi o visitante floral mais frequente, com mais de 90% de todas as visitas.

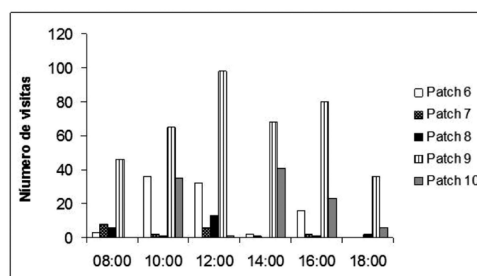
Durante o período de amostragem, o pico de visitação ocorreu ao meio dia, nas dez manchas (Fig. 2 e Fig. 3). Após esse horário as visitas diminuíram, sendo observadas poucas visitas após as 18h. De acordo com a correlação linear de Pearson, o número de visitas de insetos esteve fortemente correlacionado a densidade de flores das manchas estudadas ( $p=0,9403$ ).

O padrão de forrageio de *A. mellifera* observado em manchas de *Lupinus* sp. evidenciou que estas abelhas coletavam principalmente grãos de pólen e, em algumas visitas, néctar. Foram observados dois comportamentos de chegada à flor para a coleta de pólen. Em um deles, os indivíduos chegavam à flor frontalmente ao estandarte, pressionando as quilhas e alas (Fig. 4A e Fig. 4B). Desse modo, ocorria a projeção das estruturas reprodutivas e a coleta de grãos de pólen. O outro comportamento foi observado no forrageio em flores que ainda não tinham iniciado totalmente a antese. Nesse caso, os

**Figura 2** - Número total de visitas de insetos, durante um dia de amostragem, nas manchas 1 a 5 de *Lupinus* sp



**Figura 3** - Número total de visitas de insetos, durante um dia de amostragem, nas manchas 6 a 10 de *Lupinus* sp



**Figura 4** - Forrageio de *Apis mellifera* em flores de *Lupinus* sp. A e B: Posição frontal à flor em que *A. mellifera* pressiona as pétalas e ocorre a liberação de pólen. C e D: Posição lateral à flor em que a abelha força a abertura das pétalas utilizando a glossa



indivíduos de *A. mellifera* chegavam às flores lateralmente e introduziam a glossa no ápice das pétalas alares, forçando sua abertura (Fig. 4C e Fig. 4D). Assim, era possível coletar os grãos de pólen aderidos ao aparelho bucal.

Em todas as observações de visitas de *A. mellifera* às manchas de *Lupinus* sp. registraram-se visitas apenas às flores claras, em fase inicial de antese. As visitas consecutivas às flores ocorreram de maneira aleatória, sem uma sequência definida quanto à posição nas inflorescências.

## Discussão

*Lupinus* é um gênero representado por espécies que apresentam estratégias para maximizar a eficiência na polinização. Uma delas é a mudança da coloração floral durante a antese como um efeito de pós-polinização (GORI, 1989; STEAD; REID, 1990; NE'EMAN; NESHER, 1995; NUTTMAN; WILLMER, 2003). Desse modo, flores de coloração clara são mais atrativas aos visitantes florais, enquanto que as flores escuras, já polinizadas, indicam menos atratividade (NUTTMAN; WILLMER, 2003). O estandarte das flores de *Lupinus* sp. estudadas nesse trabalho apresenta inicialmente coloração rosa e parcialmente branca, no entanto, ao longo da antese essa coloração adquire tons mais escuros. Em *Lupinus argenteus* Pursh (GORI, 1989), a mudança de coloração floral acontece no quarto dia após o início da antese e permanecem na planta cinco a sete dias após a mudança. Portanto, ao direcionar os polinizadores às flores receptivas, essa indicação de atratividade pode evitar a deposição de pólen em flores não receptivas e coleta de pólen não viável, o que resulta em um mecanismo de eficiência de polinização da planta. Por outro lado, essa mudança de coloração beneficia o polinizador, pois também proporciona um aumento na eficiência de forrageio ao direcioná-lo às flores com mais recursos (GORI, 1989).

Corroborando os estudos realizados com *Lupinus arboreus* Sims (BARBOUR *et al.*, 1973; STOUT *et al.*, 2002) e *Lupinus pilosus* L. (NE'EMAN; NESHER, 1995; NUTTMAN; WILLMER, 2003), as visitas em flores de *Lupinus* sp. foram predominantemente realizadas pela espécie exótica *A. mellifera*, que coletou principalmente pólen. Em algumas visitas, foi observado um comportamento de coleta de néctar, como descrito por Nuttman e Willmer (2003) em flores de *L. pilosus*, nas quais a espécie *Bombus terrestris* explorava a base do estandarte sugerindo a disponibilidade do recurso. No entanto, os resultados obtidos no presente estudo mostram que a espécie não produz grande quantidade de néctar e que a concentração média de açúcar é semelhante em flores visitadas por insetos e não visitadas ao longo do dia. Portanto, o néctar não se apresenta como principal recurso floral de *Lupinus* sp., característica esta percebida por outros autores e comum em representantes do gênero (e.g. FAEGRI; VAN DER PIJL, 1979; YEO, 1993 apud NUTTMAN; WILLMER, 2003).

Durante as visitas, os indivíduos de *A. mellifera* pressionavam as quilhas e alas, o que ocasionava a liberação de uma massa de pólen coletada quando a abelha se posicionava

frontalmente ao estandarte. Segundo Alon (1986, apud NE'EMAN; NESHER, 1995), a massa de pólen surge quando os estames se alongam na pré-antese forçando o ápice das quilhas. Esse mecanismo é um dos tipos de apresentação secundária de pólen, descrito em pelo menos 25 famílias de plantas (YEO, 1993). Outra estratégia de *A. mellifera* para a coleta de pólen em *Lupinus* sp. foi forçar a abertura das flores com o aparelho bucal, comportamento não referido em outras espécies de *Lupinus*. Além disso, *A. mellifera* teve preferência por visitar as flores claras, evitando as flores de coloração escura, as quais à semelhança de outras espécies do gênero já estariam polinizadas (NE'EMAN; NESHER, 1995).

A retenção de flores já fecundadas, prolongando a longevidade floral, tem sido questionada como um evento dispendioso para a planta, porém parece conferir uma vantagem reprodutiva compensatória (GORI, 1989; NE'EMAN; NESHER, 1995). Esse mecanismo de retenção de flores polinizadas aumentou a atratividade floral em outras espécies de *Lupinus* (WAINWRIGHT, 1978; SCHAAL & LEVERICH, 1980), sendo que na espécie alvo deste estudo, a alta densidade de visitantes florais verificada nas manchas suporta essa hipótese como um dos mecanismos para maximizar a eficiência da polinização.

O efeito da atratividade floral em nível de mancha ou tamanho populacional tem sido estudado amplamente em várias espécies (SIH; BALTUS, 1987; GOULSON, 2000; STOUT, 2000; MUSTAJÄRVI *et al.*, 2001; GRINDELAND *et al.*, 2005). A hipótese de que a variação espacial no tamanho de manchas afeta a taxa de visitação foi testada apenas em *L. arboreus* (STOUT *et al.*, 2002), dentre os representantes do gênero. No presente estudo, as manchas mais densas, considerando-se o número de inflorescências/área, receberam proporcionalmente mais visitas de insetos.

Dentre os estudos que testaram a taxa de visitação em função da variação na densidade populacional de plantas, alguns mostram relação positiva (KLINKHAMER; DE JONG, 1990; KUNIN, 1997; GRINDELAND *et al.*, 2005), enquanto que outros não (e.g. BOSCH; WASER, 2001). Em *L. arboreus*, por exemplo, Stout *et al.*, (2002) não tiveram evidência de que maior densidade atrai mais polinizadores.

Neste estudo constatou-se que *A. mellifera* forrageia seguindo as indicações de atratividade floral na população estudada de *Lupinus* sp., fundamentada pelas estratégias de maximização da eficiência na polinização através da ocorrência de indivíduos em manchas e da mudança de coloração das flores. No entanto, estudos subseqüentes, com maior detalhamento e amplitude temporal na coleta de dados, são necessários para consolidar os resultados preliminares apresentados.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Dr. Leonardo Galetto pelo apoio de campo e a toda equipe de professores do Curso Internacional de Campo sobre Polinização que contribuíram com seus conhecimentos para a nossa formação.

## Referências

- AGOSTINI, K.; SAZIMA, M. Plantas ornamentais e seus recursos para abelhas no Campus da Universidade Estadual de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil. *Bragantia*, v. 62, n. 3, p. 335-343, 2003.
- ALON, G. The structure and development of the stigma, pollination mechanism and breeding system in six species of Papilionaceae. Dissertação (Mestrado, Hebrew Univ., Jerusalem), p. 42-56, 1986.
- BACKES, A.; NARDINO, M. *Nomes populares e científicos das plantas do Rio Grande do Sul*. São Leopoldo: Ed. Unisinos, 164p. 1999.
- BAWA, K. S. Plant-pollinator interactions in Tropical Rain Forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 21, p. 399-422, 1990.
- BOSCH, M.; WASER, N. M. Experimental manipulation of plant density and its effect on pollination and reproduction of two confamilial montane herbs. *Oecologia*, v. 126, p. 76-83, 2001.
- CRISTOFOLINI, G. A serological contribution to the systematics of the genus *Lupinus* (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 166, p. 265-278, 1989.
- FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. *The Principles of Pollination Ecology*. Oxford: Pergamon Press, 1979. p. 244.
- GLADSTONE, J. S. Distribution, origin, taxonomy and importance. In: GLADSTONE, J. S.; ATKINS, C. A.; HAMBLIN J. *Lupins as Crop Plants: Biology, Production and Utilization*. Cambridge: CAB Internacional, p. 1-39. 1998.
- KLINKHAMER, P. G. L.; DE JONG, T. J. Effects of plant size, plant density and sex differential nectar reward on pollinator visitation in the protandrous *Echium vulgare* (Boraginaceae). *Oikos*, v. 57, p. 399-405, 1990.
- KRUG, C.; ALVES-DOS-SANTOS, I. O uso de diferentes métodos para amostragem da fauna de abelhas (Hymenoptera: Apoidea), um estudo em Floresta Ombrófila Mista em Santa Catarina. *Neotropical Entomology*, v. 37, p. 265-278, 2008.
- KUNIN, W. E. Population size and density effects in pollination: pollinator foraging and plant reproductive success in experimental arrays of *Brassica kaber*. *Journal of Ecology*, v. 85, p. 225-234, 1997.
- MONTEIRO, R.; MONTEIRO, R. T. R. Notes on the economics aspects of *Lupinus L.* (Leguminosae) - call for studies with the Brazilian species. *Arquives Biology Technology*, v. 29, p. 685-694, 1986.

- MUSTAJÄRVI, K.; SIIKAMÄKI, P.; RYTKÖNEN, S.; LAMMI, A. Consequences of plant population size and density for plant-pollinator interactions and plant performance. *Journal of Ecology*, v. 89, p. 80-87, 2001.
- NE'EMAN, G.; NESHER, R. Pollination ecology and the significance of floral color change in *Lupinus pilosus* L. (Fabaceae). *Israel Journal of Plant Sciences*, v. 43, p. 135-145, 1995.
- NUTTMAN, C.; WILLMER, P. How does insect visitation trigger floral colour change? *Ecological Entomology*, v. 28, n. 4, p. 467-474, 2003.
- PINHEIRO, M.; MIOTTO, S. T. S. Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul: Leguminosae - Faboidae gênero *Lupinus* L. *Boletim do Instituto de Biociências*, Fasc.27. 60. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 100p. 2001.
- PYKE, G. H. Optimal foraging in bumblebees: Rule of movement between flowers within inflorescences. *Animal Behavior*, v. 27, n. 4, p. 1167-1181, 1979.
- SCHAAL, B. A.; LEVERICH, W. J. Pollination and banner markings in *Lupinus texensis* (Leguminosae). *Southwest Naturalist*, v. 25, p. 280-282, 1980.
- SIH, A.; BALTUS, M. S. Patch size, pollinator behavior, and pollinator limitation in catnip. *Ecology*, v. 68, p. 1679-1690, 1987.
- STEAD, A. D.; REID, M. S. The effect of pollination and ethylene on color change of the banner spot of *Lupinus albifrons* (Benth) flowers. *Annals of Botany*, v. 66, p. 655-663, 1990.
- STOUT, J. C. Does size matter? Bumblebee behaviour and the pollination of *Cytisus scoparius* L. (Fabaceae). *Apidologie*, v. 31, p. 129-139, 2000.
- STOUT, J. C.; KELLS, A. R.; GOULSON, D. Pollination of the invasive exotic shrub *Lupinus arboreus* (Fabaceae) by introduced bees in Tasmania. *Biological Conservation*, v. 106, p. 425-434, 2002.
- VOGEL S. *The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores*. New Delhi: Amerind xvi, 202p. 1990.
- WAINWRIGHT, C. M. The floral biology and pollination ecology of two desert lupines. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, v. 105, p. 24-38, 1978.
- WASER, N. M.; PRICE, M. V. The effect of nectar guides on pollinator preference: experimental studies with a montane herb. *Oecologia*, v. 67, p. 121-126. 1985.
- WEISS, R. M. *Ecological and evolutionary significance of floral color change*. Tese (PhD, University of California), Berkeley, U.S.A. 1992.
- YEO, P. F. Secondary pollen presentation. *Plant Systematics and Evolution*, Berlin, Suppl. 6, 1993.





## **PARTE 2**

Contribuições do curso de campo em biologia e ecologia da polinização - 2012





# A paisagem e a biodiversidade na área de estudo do Curso de Ecologia da Polinização 2012 – Chapada dos Veadeiros, GO, Brasil

Edivani Villaron Franceschinelli<sup>1</sup>

A edição 2012 do Curso Internacional de Campo sobre Ecologia da Polinização ocorreu em uma área central do Cerrado brasileiro. Esta edição foi organizada pela Universidade Federal de Goiás que, de forma geral, desenvolve seus projetos de pesquisa em estudos de biodiversidade no Cerrado.

O Bioma Cerrado possui uma extensão de dois milhões de quilômetros quadrados e localiza-se entre 5° e 20° de latitude Sul e 45° a 60° de longitude Oeste, com a maior parte de sua área localizada no Planalto Central do Brasil. A região se estende de forma contínua pelos estados de Goiás, Tocantins e o Distrito Federal, parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo e, também em áreas isoladas nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima, e ao sul, no Paraná (RIBEIRO; WALTER, 2008). Este é o segundo bioma brasileiro em extensão, depois da Floresta Amazônica e representa 23% do território nacional (EITEN, 1972).

O Cerrado engloba três formações vegetais: a savânica, a campestre e as florestais. Ocorre principalmente em solos bem drenados e profundos, mas é também encontrado em solos mais rasos. O “cerrado” *sensu stricto* ocorre principalmente no Latosolos, em menor proporção, em Neossolos, Cambisolos, Litosolos (REATTO *et al.*, 1998). As altitudes variam de 300 metros (Baixada Cuiabana - MT) a 1600 metros (Chapada dos Veadeiros - GO) (RIBEIRO; WALTER, 1998). Possui a flora savânica mais rica do mundo com mais de 12 mil espécies vegetais (MENDONÇA *et al.*, 2008) e elevados níveis de endemismo (KLINK; MACHADO, 2005). A riqueza de mamíferos (161 spp.), aves (837 spp.), peixes, répteis (120 spp.), anfíbios (150 spp.) e insetos é igualmente elevada (SEMARH/GO, 2000).

Aproximadamente 50% dos mais de dois milhões de km<sup>2</sup> da área original deste bioma foi convertida em terras agrícolas com cultivos comerciais e pastoris (MACHADO *et al.*, 2004), restando somente 20% do Bioma que podem ser considerados originais ou pouco perturbados (AGUIAR; CAMARGO, 2004). Essa conversão do uso do solo tem implicações diretas sobre a distribuição dos recursos hídricos para os outros biomas adjacentes, pois

---

<sup>1</sup> Docente da Universidade Federal de Goiás (edivanif@gmail.com)

as três maiores bacias hidrográficas da América Latina recebem águas do Cerrado. A bacia Amazônica (Araguaia-Tocantins) tem 78% de suas nascentes neste bioma, a bacia do Paraná-Paraguai possui 48%, enquanto a bacia do São Francisco tem quase 50% (ARRUDA, 2003). As taxas de desmatamento nas áreas de Cerrado são maiores que as registradas para a Amazônia, acarretando altos custos ambientais, tais como: fragmentação, perda de biodiversidade, erosão do solo, invasão de espécies exóticas, poluição da água, destruição dos habitats naturais, dentre outros. Apesar disso, esforços de conservação são modestos, pois somente 2,2% da superfície do Cerrado estão legalmente protegidas (KLINK; MACHADO, 2005). Uma das maiores áreas preservada do Cerrado está na região da Chapada dos Veadeiros.

## Chapada dos Veadeiros GO

A Chapada dos Veadeiros situa-se no nordeste goiano, na região mais alta das dobras do Vale do Rio Paranã, abrangendo os municípios de Alto Paraíso de Goiás, Campos Belos, Cavalcante, Colinas do Sul, Monte Alegre de Goiás, Nova Roma, São João da Aliança e Teresina de Goiás. A região da Chapada dos Veadeiros está sob o domínio do Clima Tropical, sub-úmido (AW), segundo Köppen, com duas estações bem definidas: aproximadamente 90% das chuvas estão concentradas de outubro a abril, enquanto na estação seca (maio a setembro) a quantidade de chuvas pode chegar à zero em alguns meses e a umidade do ar chega a abaixo de 20% (em agosto e setembro). Esta baixa umidade favorece eventos de fogo no período da seca.

A região da Chapada dos Veadeiros tem a predominância de Latossolo Vermelho-Amarelo, álico, (saturação de alumínio maior ou igual a 50%) texturas argilosas e médias, ocorrendo sobre relevo plano e ondulado suave. Também ocupam grandes extensões os solos Litólicos álicos e distróficos, cascalhentos, textura arenosa e arenosa média, em relevo que varia de plano e suave ondulado a montanhoso e escarpado (FELFILI, 2007). A Chapada dos Veadeiros possui 2.661 espécies vasculares já catalogadas e sua vegetação é complexa e se distingue pela presença de espécies típicas e endêmicas, porém são poucos os estudos sobre diversidade animal (CAVALCANTE; JOLY, 2002).

## Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros - PNCV

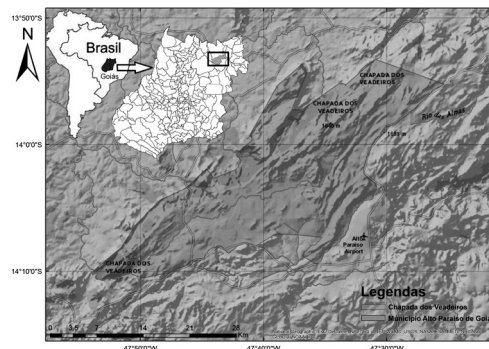
O Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros - PNCV foi criado em 1961 para proteger uma área de 625 mil ha predominante de cerrado *strictu sensu*. Em 1972 sua área foi reduzida para 171.924 ha e em 1981 passou para os atuais 65.514 mil ha (BARBOSA, 2008). Localizado no centro da Chapada dos Veadeiros, entre as latitudes 13° 51' e 14° 10' S e as longitudes 47° 25' e 47° 42' W (Fig. 1), o Parque está a 260 km de Brasília e a 480 km de Goiânia, com parte nos municípios de Cavalcante (60%) e Alto Paraíso (40%), onde se situa a

Vila de São Jorge, local de entrada dos visitantes (Fig. 1). Dentro do PNVC, predominam solos rasos e pobres em nutrientes representados por Neossolos litólicos, Cambissolos ou Plintossolos, eventualmente com afloramentos rochosos de pouca extensão (FELFILI, 2007). Estes solos impedem a colonização de plantas de maior porte, prevalecendo às formações campestres sobre o Cerrado *sensu stricto* nesta área (EITEN, 1972; FELFILI, 2007). As manchas de latossolo existentes no parque ocorrem de forma setorial e condicionam o aparecimento de Cerrado Denso e Campo Sujo. A Mata de Galeria encontra-se em solos de areia quartzosa nos vales com relevo plano (GALANTE; PAES, 1991; FELFILI, 2007). Desta forma, os campos são a fitofisionomia predominante do parque com suas diversas tipologias (Fig. 2). De acordo com ICMBio (2009), a lista de flora na área do Parque conta com 1.636 espécies descritas. Destas, 1.178 são da categoria arbustivo/herbácea (que inclui arbustos, subarbustos, ervas e trepadeiras) e 458 são arbóreas. As diferenças fitofisionômicas e florísticas já conhecidas entre o cerrado deste parque e do seu entorno confirmam a necessidade de conservação da vegetação local em uma escala mais ampla. Além disso, constata-se que as florestas estacionais (matas secas) estão desprotegidas, assim como populações endêmicas da região como *Altoparadisium chapadensis* e *Triraphys devia*.

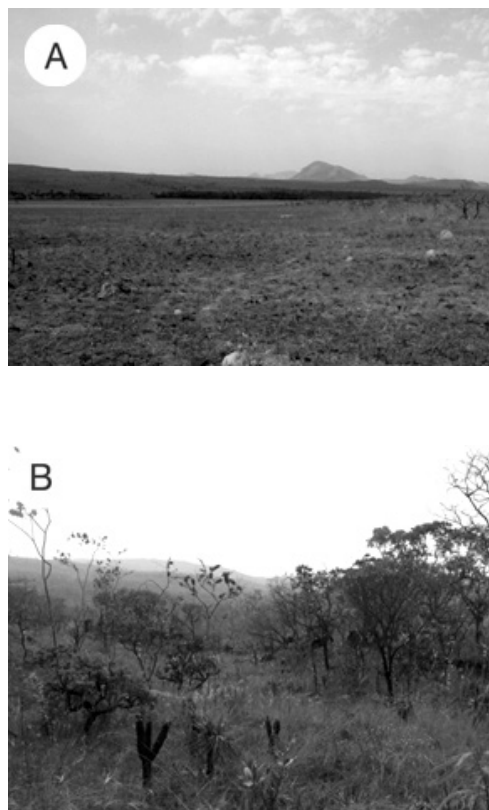
## Agradecimentos

No coração do Cerrado brasileiro, a edição 2012 do Curso de Campo Internacional sobre Ecologia da Polinização ocorreu com grande êxito para a satisfação dos participantes que

**Figura 1** - Mapa da região do Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros com destaque para o município de Alto Paraíso e a Vila de São Jorge (autores: Dardenne & Campos, 2011)



**Figura 2** - Paisagens da Chapada dos Veadeiros, Goiás: A) Áreas de Campo Limpo, B) Campo Sujo e do C) Canyon I



enfrentaram o período mais seco e quente deste bioma. A coordenação desta edição agradece imensamente os funcionários do PNCV, em especial o Diretor Leonard Schumm, pela receptividade e apoio durante a realização de nossas atividades. A coordenação agradece também os professores que proferiram as excelentes palestras e orientaram os trabalhos apresentados neste livro. Por fim, aos professores permanentes deste curso, Dr. Peter Kevan, Dra. Blandina Felipe Viana, Dra. Fabiana Oliveira da Silva, Dra. Favizia Freitas de Oliveira e Dr. Breno Freitas, nossos agradecimentos pelo apoio durante a organização desta edição do curso.



## Referências

AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO A. J. A. Cerrado: Ecologia e Caracterização. Planaltina; DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 249.

ARRUDA, M. B. Representatividade ecológica com base na biogeografia de biomas e ecorregiões continentais do Brasil: O caso do bioma cerrado. 2003. Tese (Doutorado em Ecologia), Universidade de Brasília, Brasília, 2003.

BARBOSA, A. G. *As estratégias de conservação da biodiversidade na Chapada dos Veadeiros: Conflitos e oportunidades*. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

CARVALHO JÚNIOR, O. A. et al. Classificação de padrões de savana usando assinaturas temporais NDVI do sensor MODIS no Parque Nacional Chapada dos Veadeiros. *Revista Brasileira de Geofísica*, v. 26, n. 4, p. 505-517, 2008.

CAVALCANTI, R.; JOLY, C. A. Biodiversity and conservation priorities in the Cerrado region. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical Savanna*. New York: Columbia University Press, 2002. p. 351-367.

DARDENNE, M. A.; CAMPOS, J. E. G. Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, GO - Sítio de grande beleza cênica do centro-oeste brasileiro. *Sítios geológicos e paleontológicos do Brasil*, v. 1, p. 323-333, 2002.

EITEN G. The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review*, v. 38, n. 2, p. 201–341, 1972.

FELFILI, J. M. A Chapada dos Veadeiros. In: FELFILI, J. M., REZENDE, A. V. E SILVA-JÚNIOR, M. C. *Biogeografia do Bioma Cerrado: vegetação e solos da Chapada dos Veadeiros*. UnB/ Finatec: Brasília, p. 15-23, 2007.

GALANTE, M. L.; PAES, M. L. *Orientações básicas ao manejo do Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros-GO, preliminares ao plano de manejo*. Brasília: IBAMA, 1991.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. *Plano de Manejo do Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros*. Brasília, DF, p. 226, 2009.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology*, v. 19, p. 707-713, 2005.

MACHADO, R. B. et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. *Relatório técnico não publicado*. Conservação Internacional, Brasília, DF. 2004.

MENDONÇA, R. C. de. et al. Flora vascular do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. DE.; RIBEIRO, J. F. *Cerrado: ecologia e flora*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. v. 2, 2008. p. 421-442.

REATTO, A. et al. Solos do Bioma Cerrado: aspectos pedológicos. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. *Cerrado: ecologia e flora* Embrapa Cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p.108-149.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomia do bioma Cerrado. In: SANO, S. M. & ALMEIDA, S. P. *Cerrado ambiente e flora*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p. 89-152, 1998.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. *Cerrado: ecologia e flora*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. p.151-212.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS E HABITAÇÃO -SEMARH/GO. *Área de Proteção Ambiental Pouso Alto*. Goiânia. 2000.





# Nectar production and floral visitors of *Dyckia* sp. (Bromeliaceae: Pitcarnioideae) after fire in a Cerrado Rupestre

Maria Cecília de Lima e Sá de Alencar Rocha<sup>1</sup>

Marcelo Kuhlmann Peres<sup>2</sup>

Hakbong Lee<sup>3</sup>

Carlos de Melo e Silva Neto<sup>4</sup>

The knowledge of the floral and reproductive biology of plants is important to understand how organisms evolve in an ecosystem. The pollination process is influenced by the morphology of the flower, the availability of floral resources, the visitors' behavior and by the frequency and regularity of visits (OLLERTON, 1999).

The concordance between morphological adaptations of the pollinator and the plant may favor pollination, having some species closest animal/plant relationships than others (SILBERBAUER; GOTTSBERGER, 1988). The floral morphology is one of the most important aspects of plant-pollinator interactions, because it determines the accessibility of the pollinator to nectar, the pollen deposition efficiency in the body of pollinators and the acquisition of pollen by the stigma, through vectors. Pollinators, in turn, have behavior patterns that allow them to have access to floral resources (SANTOS; OLIVEIRA, 2007).

Floral nectar is widely known as a key reward offered in animal-pollinated plants to their pollen vectors. Nectar composition differs between plants and between similar plant species and different pollinators show preferences for solutions of different viscosity and/or sugar composition (GALETTO; BERNARDELLO, 2003).

The family Bromeliaceae is endemic from Neotropical region and is subdivided into three subfamilies: Pitcarnioideae, Bromelioideae, Tillandsioideae. In Brazil were listed yet 20 genera and 248 species in the Cerrado Biome (FORZZA *et al.*, 2013). Bromeliads are predominantly ornithophily, being one of the few families that the pollination by vertebrate

---

<sup>1</sup> Universidade Federal da Bahia (mariaclsar@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade de Brasília (biomakp@gmail.com)

<sup>3</sup> Chuncheon National University (mforester@naver.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Goiás (carloskoa@gmail.com)

predominates over insects (SANTOS; OLIVEIRA, 2007). However, still there are few studies relating the types of floral visitors and nectar production in the Cerrado bromeliads.

*Dyckia* is a typical genus from Bromeliaceae family in Cerrado, being all terrestrial plants in form of small rosettes with fleshy triangular leaves, forming compact sets under the rocks. Some species are adapted to extreme environmental variations caused by alternating droughts and floods (POMPELLI; GUERRA, 2004). Ornithophilous bromeliads have attractive inflorescences, tubular corolla flowers with resistant walls and pink or red bracts. Anthesis usually occurs in the morning and there is high production of nectar and pollen (FAEGRI; VAN DER PIJL, 1979).

The present work was undertaken to study and compare the floral nectar production during the day and relate it with visitors of *Dyckia* sp. (Bromeliaceae) in a burned Cerrado Rupestre, addressing the following questions: 1. What are the production dynamics of nectar throughout the lifetime of the flower?; 2. What is the floral response to nectar removal?; 3. What are the local flower visitors?

## Material and Methods

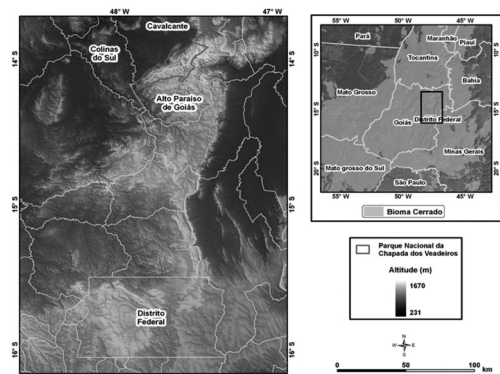
### *Study area*

The study was conducted during the end of the dry season in a burned Cerrado Rupestre, next to the Chapada dos Veadeiros National Park, GO, Brazil, at coordinates 14°10'45.89"S and 47°49'13.37"W (Fig. 1).

The Cerrado region is in the middle latitudes and presents the Tropical Seasonal climate (Aw). Approximately 90% of rains are concentrated from October to April, while the dry season (May to September) the humidity is below 20% in August and September. This behavior causes a seasonal water stress that favors fire events (FELFILI *et al.*, 2007).

The experiment was conducted during 3 days, as part of the program of the International Pollination Course on September 2012. *Dyckia* individuals occurred scattered in a small area, where were counted about 40 individuals producing an inflorescence.

**Figure 1** - Location Map of the Chapada dos Veadeiros National Park (Carvalho Júnior *et al.*, 2008)



## Flower morphology and biology

The flowers were dissected, measured with a caliper rule, drawn and the morphology described. The height of 16 individuals was also measured and the number of flowers in each inflorescence was counted every two days (a total of four observations), observing how many was old, new or buds to deduce the phenology.

To estimate the number of pollen grains per anther, flowers were collected from six inflorescences, totaling 12 flowers and 24 anthers. The flowers were preserved in FAA and later it was applied carmine acetic dye to 1% on the pollen grains. The pollen grains were counted using the manual count optical microscope at 100x magnification and were also measured and morphologically characterized.

## Nectar collection

For the quantification of nectar volume and concentration 16 individuals were marked and enclosed to prevent access of floral visitors. The flowers buds that were close to opening were also marked to ensure that the measured flowers of the inflorescence were the ones that opened during the day of the experiment.

After anthesis, information was collected about the concentration (%) and production ( $\mu$ l) of nectar, using a refractometer and manual syringe (1ml). Collecting nectar impact was tested and data were collected from 6:00 AM to 06:00 PM with intervals of 4h: at 6:00, 10:00, 14:00 and 18:00. Each interval was considered as a treatment, as shown below on Table 1.

**Table 1** - The 16 individuals were divided in 4 groups (G1-G4) for the quantification of nectar concentration (C) and volume (V) and to test the collecting nectar impact. For example, Group 1 was measured from 6:00 to 18:00, while Group 4 only at 18:00

Time	06:00		10:00		14:00		18:00	
Group	C	V	C	V	C	V	C	V
G1 - I1								
G1 - I2								
G1 - I3								
G1 - I4								
G2 - I1	-	-						
G2 - I2	-	-						
G2 - I3	-	-						
G2 - I4	-	-						
G3 - I1	-	-	-	-				
G3 - I2	-	-	-	-				
G3 - I3	-	-	-	-				
G3 - I4	-	-	-	-				
G4 - I1	-	-	-	-	-	-		
G4 - I2	-	-	-	-	-	-		
G4 - I3	-	-	-	-	-	-		
G4 - I4	-	-	-	-	-	-		

## *Floral visitors*

There were focal observations to identify the floral visitors and how many time they spent in each inflorescence. The observations occurred also from 6:00 AM to 06:00 PM with intervals of 4h: at 6:00, 10:00, 14:00 and 18:00.

Birds visiting the flowers were photographed and later identified by experts. Insect visitors were collected with the help of entomological nets and deadly cameras. Floral visitors were categorized as effective pollinators or pillagers through field observations, having been evaluated the resources used by visitors based on their behavior during visits. The pollination syndrome categorization was done by analysis of floral traits (FAEGRI; VAN DER PIJL, 1979).

## Results and Discussion

### *Flower morphology and biology*

The flowers of *Dyckia* sp. are hermaphrodite, sessile, and have a tubular red corolla. The stamens are included and are joined together at the base of the corolla tube. The anthers are positioned above the stigma and sometimes protrude above the opening of the corolla tube. The ovary is tricarpeal and pluriovulated. The flower formula was: petals (3), sepals (3), stem (6), pistil (3) and variations in size for the main flower structure are shown in Table 2.

**Table 2** - Measurements of main structures of *Dyckia* sp. flower

Structure	Average (mm)	SD
Flower Length	12.87	0.8
Flower Weight	4.77	0.12
Petal Length	10.75	0.98
Sepal Length	9.88	1.09
Stamen Length	10.47	0.62
Pistil Length	7.06	0.8
Ovary diameter	0.91	0.29

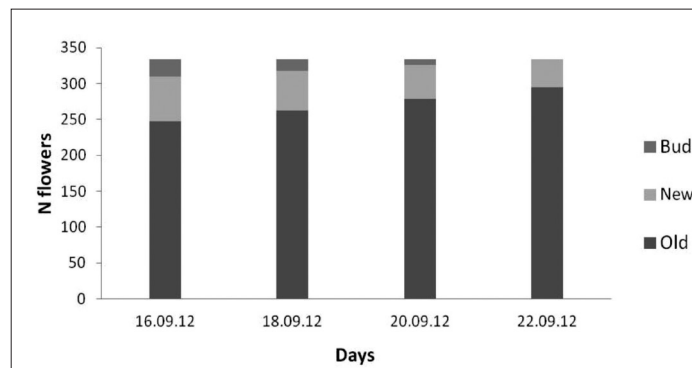
*Dyckia* sp. presents a flowering that is associated with fire, what is presumed for the presence of plants in the local that did not burned and did not produced an inflorescence. Its strategy flowering is like “steady state”, with few open flowers per day over an extended period (SANTOS; OLIVEIRA, 2007).

Fire is a common feature of the cerrados, as it is for most savanna ecosystems. Cerrado fires are characterized as surface fires, which consume the fine fuel of the herbaceous layer (MIRANDA *et al.*, 2002). Other studies in Cerrado have already demonstrated that fire stimulates flowering and reproduction of some species. Burning promotes dormancy

breaking of buds and the dehiscence of fruits and seed dispersion of some herbs and shrubs and could favor the germination of some species (MUNHOZ; FELFILI, 2007).

Each inflorescence had an average of  $20 \pm 6$  flowers, being in average 16 old flowers, 3 new ones and at least 1 bud. The duration of the flower was only one day and this evidences that the individuals of *Dyckia* sp. observed was in the end of flowering (Fig. 2).

**Figure 2** - Number of flowers from 16 individuals and inflorescence phenology from 16/09 to 22/09 (a total of 4 observations)



The inflorescence of *Dyckia* sp. is a raceme with flowers radially arranged that develop gradually, from the button to the top. Each individual produces only one red erect inflorescence, rarely two, with a length average of  $45 \text{ cm} \pm 9.45$  (Fig. 3).

The pollen grains of *Dyckia* sp. are globose and mono furrowed, presenting irregular microrreticulate exine (Fig. 4). They also have oily residues involving them, which may influence their carrying by pollinators. The average production of pollen grains was  $3.709 \pm 2.469$  units per anther, totaling approximately 22,254 grains per flower and 445,080 per inflorescence.

The ratio pollen/ovule is approximately 620, classifying, thus, *Dyckia* sp. as xenogamic facultative species (CRUDEN, 1977). A study showed that the specie *D. brevifolia* is self-compatible, which corroborates the results found for the majority of species with restricted distribution (KARRON, 1987; HAMRICK; GODT 1989; HAMRICK *et al.*, 1991; GITZENDANNER; SOLTIS, 2000; COLE, 2003).

Furthermore, *D. ferox* and *D. Tuberosus* are self-incompatible (BIANCHI *et al.*, 2000; VOSGUERITCHIAN; BUZATO, 2006), but Benzing, 1980, showed that self-compatibility and self-incompatibility coexist in the same genus, and may be altered by events such as fire, like occurred in the area of this present work.

**Figure 3** - Morphology of *Dyckia* sp. (A) Raceme inflorescence; (B) Flowers radially arranged with tubular red corolla; (C) Drawn of the entire plant; (D) Burned bulbs without leaves; (E) Not burned plant with dry leaves and without inflorescences; (F) Stigma detail; (G) Flower verticils; (H) Stamen and pistil detail

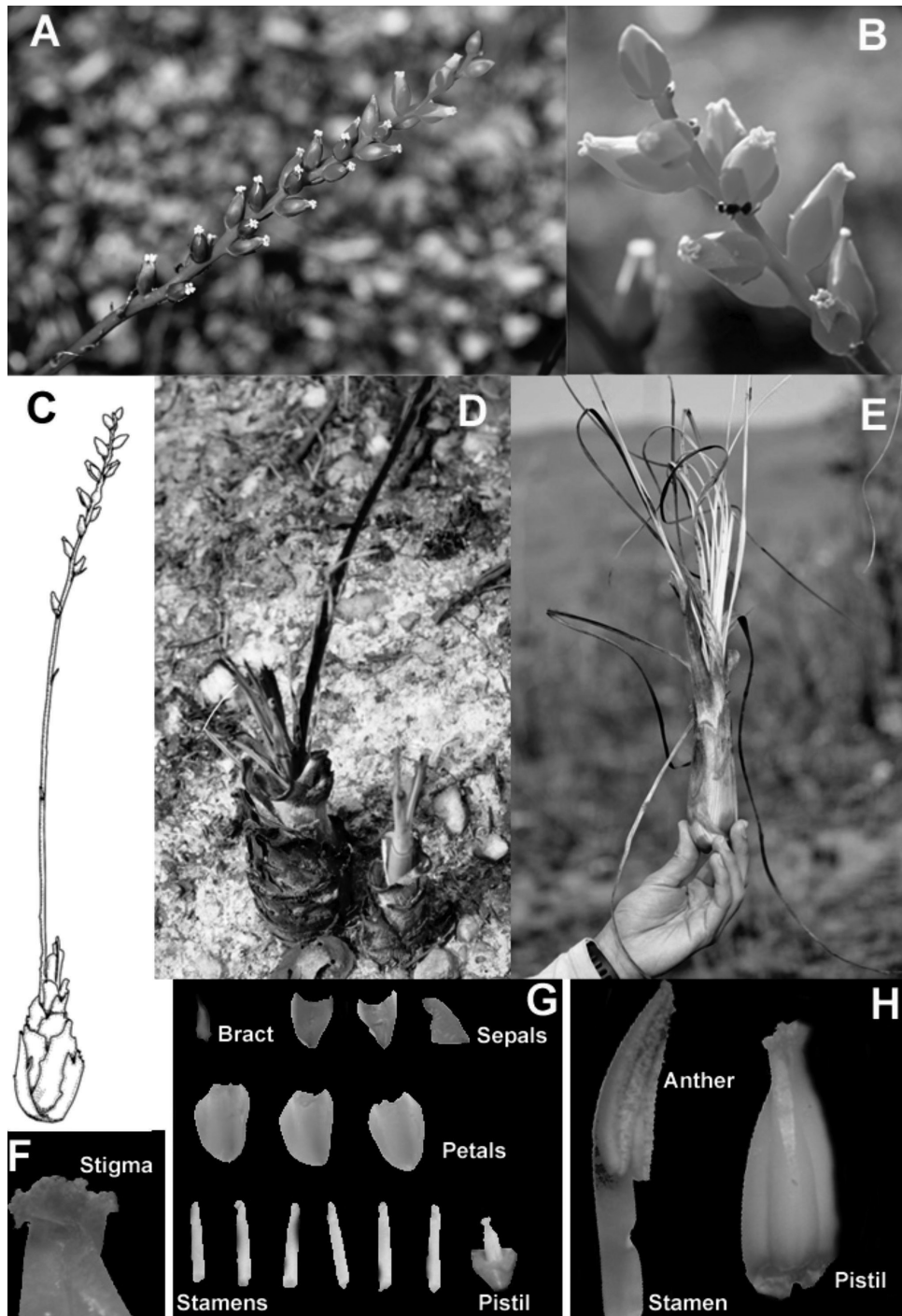
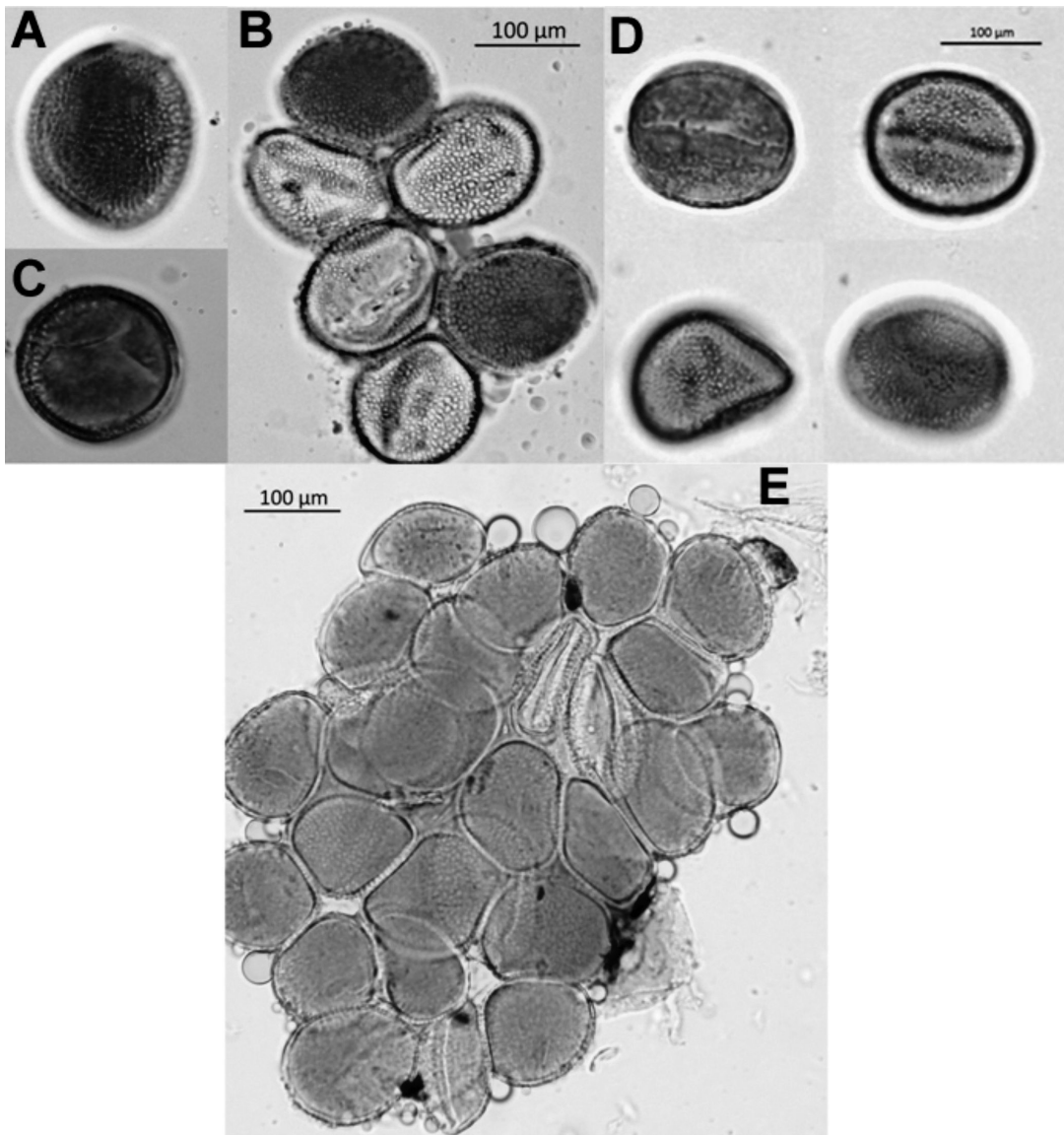


Figure 4 - Pollen grains of *Dyckia* sp. in detail (A-D) and grouped (E) in oily compound (Pollenkit)



### *Nectar analysis*

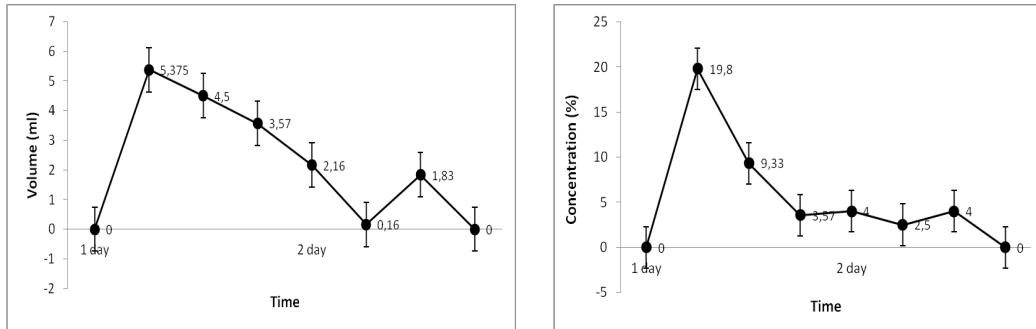
*Dyckia* sp. anthesis occurred on 6:00 am and the flower duration was about two days. Nectar production began after anthesis and peaked at 10:00 am (Fig. 5). The average of sugar concentration in the nectar throughout the day did not vary significantly ( $F_{2, 7} = 0.632$ ;  $p = 0.559$ ). Nevertheless, nectar production appears to occur only on the first day, since the day after anthesis the volume was considerably reduced.

The range of higher nectar volume production coincided with the highest concentration of sugars and the higher visitation, as the peak visitation was during a period of large supply of the resource (Fig. 6). The average of nectar production, considering only the flowers that were

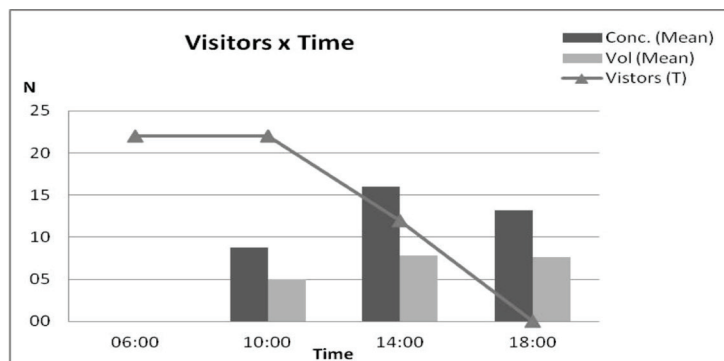


not subject to the test removal impact, was 23.2 ml, and the concentration was 13.1%, which matches what is expected for the ornithophilous flowers (FAEGRI; VAN DER PIJL, 1979).

**Figure 5** - Average of volume change (A) and concentration (B) of nectar over the two days of measurement



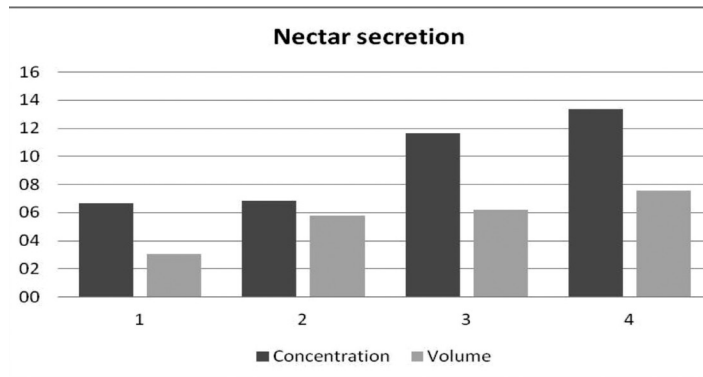
**Figure 6** - Relation between visitation rate and nectar offer



The dynamics of the production of this resource varies over the lifetime of a flower. This is because the nectar is secreted in different ways in different plant species. The knowledge of this dynamic is critical to understanding the plant-pollinator relationship, because through it we can see some aspects of this partnership, as the strategy used by the plant for the offering of nectar, the activity patterns, the frequency and diversity of pollinators of a plant species, the rate of consumption of nectar by visitors and others (GALETTO; BERNARDELLO, 2004; 2005).

The removal of nectar by floral visitors can have a large effect on its total production, with the amount of sugar in the nectar increasing or decreasing (GALETTO *et al.*, 1997; CASTELLANOS *et al.*, 2002). However, in some species, the removal does not result in any effect (GALETTO; BERNARDELLO, 1993). This seems to be the case of *Dyckia* sp., since there was no significant impact on tests of removal of this feature ( $F_{3, 12}=0.042$ ;  $p=0.891$ ) (Fig. 7).

**Figure 7** - Nectar removal effect during the Day for the four groups (G1-G4) analyzed



### Flower Visitors

The visits began in the morning, at 6:00 am, and after 14:45 visits were no more observed, suggesting that nectar pattern production of *Dyckia* sp. during the day coincides with the foraging period of the flower visitors. The flower visitors observed were (Fig. 8): two species of hummingbirds (Trochilidae), *Colibri serrirostris* (female) and *Heliactin bilophus* (female); two unidentified species of butterflies (Lepidoptera); a species of small bee (*Dialictus* sp.); a species of large bee (*Xylocopa* sp.); and a species of Diptera.

The visitors were classified according to their behavior in the flowers and frequency of visits (Tab. 3). The hummingbirds and butterflies visited the flowers in search of nectar, being considered pollinators, and the bees and diptera in search for pollen as a reward, being considered as pillagers. The hummingbird *Colibri serrirostris* was the most frequent and the principal pollinator of *Dyckia* sp., showing also some territorial behavior. These same behavior of visitors were observed by Bernardello *et al.* (1991) and Santos & Oliveira (2007) for others *Dyckia* species.

**Table 3** - Flower visitors of *Dyckia* sp. and their main aspects of behavior during three days observations

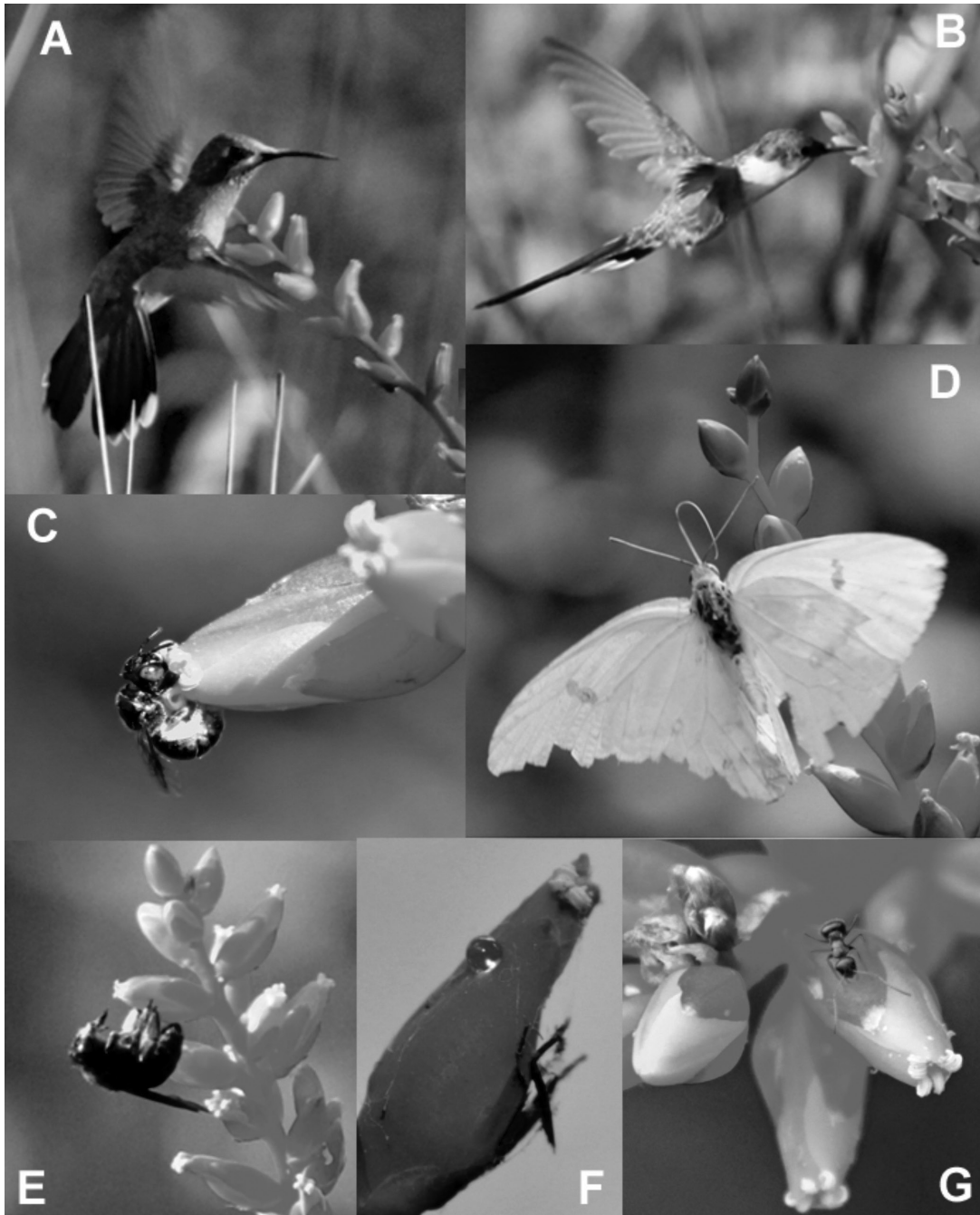
Visitor	Number of visits	Average visit time (s)	Foraging range	Behavior	Reward
Trochilidae					
<i>Colibri serrirostris</i>	11	10,7	6:00 - 14:30	Pollinator	nectar
<i>Heliactin bilophus</i>	6	11	6:00 - 7:00	Pollinator	nectar
Lepidoptera					
Butterfly 1	22	3,5	10:00 - 14:45	Pollinator	nectar
Butterfly 2	3	7,3	10:30 - 14:40	Pollinator	nectar
Bees					
<i>Dialictus</i> sp.	9	36	10:00 - 14:30	Pillager	pollen
<i>Xylocopa</i> sp.	6	11	7:00 - 7:45	Pillager	pollen
Diptera	1	3	14:45	Pillager	pollen

It was also observed that at least three species of ants were permanently patrolling the inflorescence, associated with the presence of extrafloral nectaries. Vesprini *et al.*, (2003) reported this mutualistic association in Bromeliaceae, showing that ant-excluded plants produced fewer fruits and seeds than ant-accessible plants. It was observed in the field that these ants really were protecting the flowers, when it sent away the pillager visitors as bees and dipteral (Fig. 8).

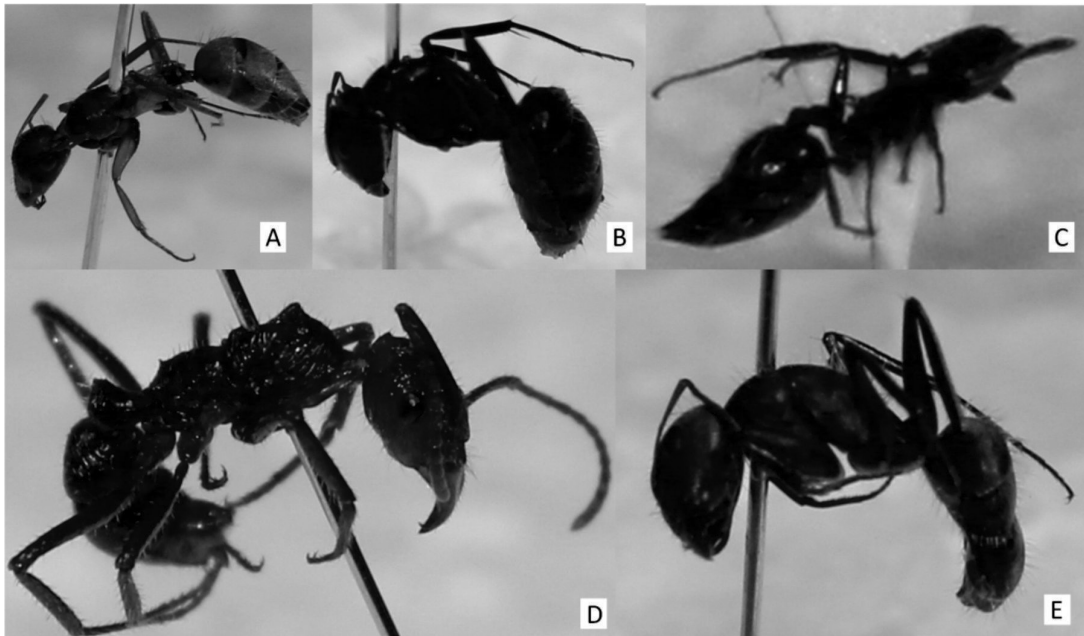
By the presence of extrafloral nectaries in other *Dyckia* species, it is considered that the ant-plant interaction is common in the group and, together with the action of pollinators, determines reproductive success in these species. However, ants (Formicidae) foraging inflorescences may interfere negatively in pollination and fruit production, due to the fact of preying the reproductive organs in different developmental stages (VESPRINI *et al.*, 2003). In *D. leptostachya*, for example, does not have extrafloral nectaries and it was observed that the ants fed on floral tissues and nectar. It seems to be common to the genus *Dyckia* attracting ants and Vesprini *et al.*, (2003), in a study with *D. floribunda*, observed a mutualistic interaction with ants, noting that the reproductive success of this species was maximized in the presence of ants.

On *Dyckia* sp. was found five different ant species: *Camponotus* sp.; *Paratrechina* sp1.; *Paratrechina* sp2.; *Crematogaster* sp. and *Ectatomma* sp. (Fig. 9). All of them apparently used the extrafloral nectaries as resources. By the way, when ants were present consuming this resource on the flower, it was not visited by the pillagers, as the bees and diptera. But the presence of ants did not intimidate the hummingbirds, the effective pollinators. The biggest ant species, *Ectatomma* sp. and *Paratrechina* sp2., are more visible to the flower visitors, but smaller ant species, as *Crematogaster* sp., occurred in greater amounts in the inflorescences.

**Figure 8** - Flower visitors of *Dyckia* sp. (A) *Colibri serrirostris* (female); (B) *Heliactin bilophus* (female); (C) Small bee *Dialictus* sp.; (D) Butterfly 1; (E) Large bee *Xylocopa* sp.; (F) Extrafloral nectary; (G) Mutualistic ant

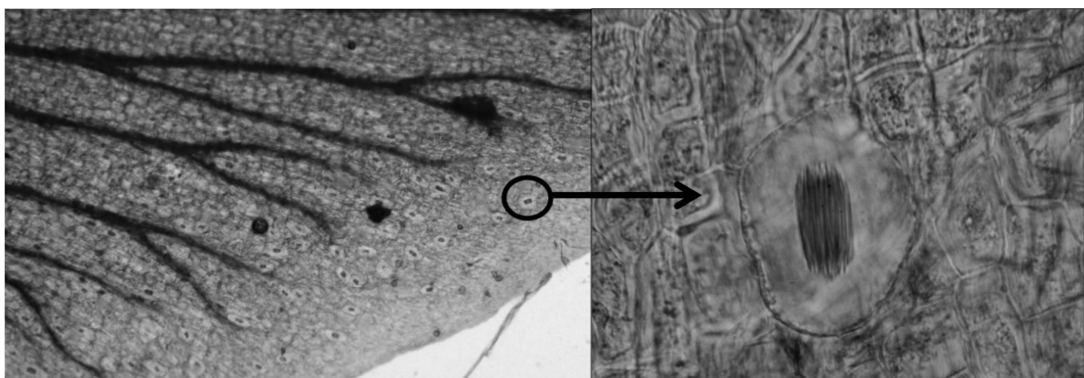


**Figura 9** - Ant species found on *Dyckia* sp. A: *Camponotus* sp. (7 mm length); B: *Paratrechina* sp1. (6,5 mm length); C: *Crematogaster* sp. (3,5 mm length); D: *Ectatomma* sp. (8 mm length); E: *Paratrechina* sp2. (4,5 mm length)



It was observed on petal margins of *Dyckia* sp. crystals in forms of raphides (Fig. 10), with may function as mechanical protection against herbivory. Thus, it can direct the ant's behavior to consume the extrafloral nectaries, instead of not consume important parts of the flower (LUCAS *et al.*, 2000; ALMEIDA CORTEZ, 2005).

**Figura 10** - Raphides on the petal margin of *Dyckia* sp



## Final Comments

Despite offering resources in a burned field, where such offer is scarce, *Dyckia* sp. does not seem to be the primary source of food for the hummingbirds observed, due to fewer visits and the small volume of nectar found. But due to the short observation time, it is recommended to conduct a more accurate analysis of the nectar production pattern. Although flowers of *Dyckia* sp. presents typical features of the ornithophilous syndrome, it was observed, beyond the species of hummingbirds, different visitors. Some were classified as pillagers (bees and diptera), and others as pollinators (hummingbirds and butterflies), when they appeared to have contact with the reproductive parts of the flower.

This study also found that *Dyckia* sp. is a species not yet described in science, a fact confirmed by experts in Bromeliaceae for which the samples were sent. Thus, it was not possible to find more information about the specie biology, and this study may be the first report conducted to date for this plant.

## References

- ALMEIDA-CORTEZ, J. S. Herbivoria e mecanismos de defesa vegetal. In: NOGUEIRA, R. J. M. C.; et al. *Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas*. Recife: UFRPE/Imprensa Universitária, p.389-396. 2005.
- BENZING, D. H. *The biology of the bromeliads*. California: Mad River Press, 305p, 1980.
- BERNARDELLO L. M., GALETTO L., JULIANI H. R. Floral Nectar, Nectary Structure and Pollinators in Some Argentinean Bromeliaceae. *Annals of Botany*, n. 67, p. 401-411, 1991.
- BIANCHI, M. B.; GIBBS, P. E.; PRADO, D. E.; VESPRINI, J. L. Studies on the breeding systems of understory species of a Chaco woodland in NE Argentina. *Flora*, n. 195, p. 339-348, 2000.
- CARVALHO JUNIOR, A. O.; et. al. Classificação de padrões de savana usando assinaturas temporais NDVI do sensor MODIS no Parque Nacional Chapada dos Veadeiros. *Revista Brasileira de Geofísica*, n. 4, v. 26, p. 505-517, 2008.
- CRUDEN, R. W. Pollen-ovule ratio: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, n. 31, p. 32-46, 1977
- FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. *The Principles of Pollination Ecology*. Oxford: Pergamon Press, 1979. p. 244.
- FELFILI J. M., REZENDE A. V.; SILVA JÚNIOR M. C. *Biogeografia do Bioma Cerrado: vegetação e solos da Chapada dos Veadeiros*. Brasília: Editora da Universidade de Brasília/Finatec, 2007.

- FORZZA, R. C.; et al. Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB66>>. Accessed in: Sep. 2013.
- GALETTO, L.; BERNARDELLO, G. Nectar secretion pattern and removal effects in three species of Solanaceae. *Canadian Journal of Botany*, n. 71, p. 1394-1398, 1993.
- GALETTO, L.; BERNARDELLO, G.; RIVERA, G. Nectar, nectaries, flower visitors, and breeding system in some Argentinean Orchidaceae. *Journal of Plant Research*, n. 110, p. 393-403, 1997.
- GALETTO, L.; BERNARDELLO, G. Nectar sugar composition in angiosperms from Chaco and Patagonia (Argentina): an animal visitor's matter? *Plant Systematics and Evolution*, n. 238, p. 69-86, 2003.
- GALETTO, L.; BERNARDELLO, G. Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six Ipomoea species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of Botany*, n. 94, p. 269-280, 2004.
- GALETTO, L.; BERNARDELLO, G. Nectar. In: DAFNI, A; KEVAN, P; HUSBAND, B. C. *Practical pollination biology*. Cambridge: Enviroquest, p. 261–313. 2005.
- GITZENDANNER, M. A.; SOLTIS, P. S. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany*, n. 87, p. 777-786, 2000.
- KOPTUR, S. Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. In: BERNAYS, E. *Insect-plant interactions*. CRC Press.1992. p.81-129.
- LUCAS, P. W.; et al. Mechanical Defences to Herbivory. *Annals of Botany*, v. 86, p. 913-920, 2000.
- MIRANDA, H. S.; BUSTAMANTE, M. M. C.; MIRANDA, A. C. The Fire Factor. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. *The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna*. Columbia University Press, 2002.
- MUNHOZ, C. B. R.; FELFILI, J. M. Reproductive phenology of an herbaceous-subshrub layer of a Savannah (Campo Sujo) in the Cerrado Biosphere Reserve I, Brazil. *Brazilian Journal Biology*, n. 67, v. 2, p. 299-307, 2007.
- OLLERTON, J. La evolucion de las relaciones polinizador-planta en los artropodos. *Ecologia Evolutiva*. Northampton, Reino Unido. Bol. S.E.A. Sécción V. 741-758, n. 26, 1999.
- POMPELLI, M. F.; GUERRA, M. P. Ex situ conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, n. 4, p. 273-279, 2004.
- SANTOS, D. R. A.; OLIVEIRA, E. L. *Biologia reprodutiva e ecologia de polinização de Dyckia leptostachya Baker (Bromeliaceae: Pitcarnioideae) em uma área de cerrado no Parque Municipal do Bacaba, Nova Xavantina, MT*. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade do

Estado de Mato Grosso, Campus de Nova Xavantina, Departamento de Ciências Biológicas. 2007.

SILBERBAUER, I. G.; GOTTSBERGER, G. A. polinização de plantas do Cerrado. *Revista Brasileira Biologia*, n. 48, p. 651-663, 1988.

VESPRINI, J.L.; GALETTO, L.; BERNARDELLO, G. The beneficial effect of ants on the reproductive success of *Dyckia florinbunda* (Bromeliaceae), an extrafloral nectary plant. *Canadian Journal of Botany*, v. 1, n. 81, 2003.

VOSGUERITCHIAN, S. B.; BUZATO, S. Reprodução sexuada de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) e interação planta-animal. *Revista Brasileira de Botânica*, n. 29, p. 433-442, 2006.





# Biologia Floral, enantiostilia, sistema reprodutivo e potenciais polinizadores de *Callisthene minor* Mart (Vochysiaceae), Chapada dos Veadeiros – Brazil

Sheila Milena Neve Araújo Soares<sup>1</sup>

Tatiana Guterres Kaehler<sup>2</sup>

Renata Brito Araujo<sup>3</sup>

Denver Falconer<sup>4</sup>

Daniel de Paiva Silva<sup>5</sup>

Victor Magalhães Monteiro<sup>6</sup>

Atualmente sabe-se que cerca de 80% das espécies de angiospermas são hermafroditas (ENDRESS, 1994; BARRETT, 2000; WILLMER, 2011). Estas espécies podem exibir variadas estratégias reprodutivas para evitar autopolinização e reduzir as chances de endogamia e baixo sucesso reprodutivo (JONG *et al.*, 1993; WILLMER, 2011). A diversidade de estratégias, combinadas ou não, para evitar autopolinização e autofecundação inclui mecanismos de desenvolvimento (dicogamia), estruturais (hercogamia, heterostilia, monoiccia, dioiccia e enantiostilia) e fisiológicos (autoincompatibilidade) (ENDRESS, 1994).

Dentre as estratégias estruturais, a enantiostilia é caracterizada por um polimorfismo floral, na qual o estigma pode estar voltado para direita (*right flowers*) ou para esquerda (*left flowers*) em relação ao eixo floral (BARRETT, 2000; WILLMER, 2011). Este mecanismo possibilita que a deposição do pólen no corpo do visitante seja diferenciada de acordo com o tipo morfológico da flor, evitando que o pólen entre em contato com estigma da sua flor de origem (ver BARRETT, 2000 para revisão). A enantiostilia está geralmente associada a espécies com flores de polén, com heteranteria, polinização por abelhas e por vibração (WILLMER, 2011; BUCHMANN, 1983).

Contudo, apesar dessa estratégia morfológica evitar a autopolinização, ainda há a possibilidade de geitonogamia, caso os dois tipos morfológicos (flor direita e esquerda)

---

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Piauí (sheilamilenaneves@gmail.com)

<sup>2</sup> Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (tatigk@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal da Bahia (tatabiologica@gmail.com)

<sup>4</sup> University of Saskatchewan (denver.falconer@usask.ca)

<sup>5</sup> Universidade Federal do Pará (daniel.paivasilva@gmail.com)

<sup>6</sup> Universidade Federal do Ceará (victormonteiro@hotmail.com)

ocorram em uma mesma planta, a chamada enantiostilia monomórfica (BARRETT, 2000). A geitonogamia é a polinização de flores por pólen de outras flores da mesma espécie, mas de um mesmo indivíduo. As espécies monóicas e hermafroditas podem exibir estratégias para evitar a geitonogamia como a dicogamia, dioicia temporal e auto-incompatibilidade (JONG *et al.*, 1993).

A família Vochysiaceae é uma família com espécies em sua maioria de ocorrência tropical e largamente distribuídas nas savanas brasileiras (OLIVEIRA, 1998). Esta família possui três gêneros com ocorrência de enantiostilia: *Salvertia*, *Qualea* e *Callisthene* (OLIVEIRA, 1998). Este trabalho propõe investigar a biologia floral, polinização e a eficiência da enantiostilia para evitar autopolinização e geitonogamia em flores da espécie *Callisthene minor* Mart. da família Vochysiaceae.

## Meterial e Métodos

### *Biologia floral*

A morfologia e a antese floral de *C. minor* foram analisadas de 20 de setembro a 26 de setembro de 2012 através da marcação de botões florais em pré-antese e com as observações das modificações florais até a senescência da pétala. A determinação da receptividade estigmática foi testada utilizando-se água oxigenada a 3% (KEARNS; INOUE, 1993) durante a antese.

O volume e a concentração de néctar em botões em pré-antese, flores disponíveis a visitação e o néctar acumulado em flores ensacadas, foram medidos com o auxílio de microsseringa de Hamilton 10 $\mu$ l e a concentração foi verificada com o auxílio de um refratômetro de bolso de 50% (DAFNI *et al.*, 2005). Sete indivíduos foram marcados e 41 inflorescências e 320 flores foram contadas para verificar a razão entre os dois tipos morfológicos.

### *Sistema Reprodutivo*

Trinta flores distribuídas em sete indivíduos da espécie *C. minor* foram marcadas para cruzamentos por geitonogamia (15 flores) e xenogamia (polinização cruzada, um total de 15 flores). Nos experimentos de geitonogamia o pólen de uma flor *esquerda* foi utilizado para cruzamento em um mesmo indivíduo em uma flor *direita*. No experimento de xenogamia o mesmo foi procedido, exceto que o pólen foi cedido de um indivíduo diferente. Após 72 horas, foi verificado se existia algum sinal morfológico de fecundação, como mudança na coloração ou intumescimento do ovário. Os ovários nos dois tratamentos foram coletados 72h após os cruzamentos e fixados em FAA 50% para observação de crescimento de tubos polínicos em microscopia de fluorescência. Foram analisados, em separado, os pistilos dos dois tratamentos.

### *Visitantes florais*

A amostragem de abelhas realizou-se por observação e através do método de captura direta utilizando rede entomológica. A coleta ocorreu durante três dias consecutivos, das 6h as 12h da manhã em seis exemplares de *Callysthenes minor* que apresentavam quantidade suficiente de flores abertas para atrair os insetos. As abelhas identificadas apenas por observação em campo foram anotadas na planilha e, sempre que possível, um exemplar de cada morfotipo foi capturado. Os insetos foram sacrificados em câmara mortífera com acetato de etila e acondicionados dentro de potes devidamente etiquetados. Posteriormente foram montados utilizando alfinetes entomológicos e identificados.

A taxa de visitantes florais foi realizada através do método descrito por DAFNI *et al.*, (2005), onde se observava por dez minutos uma inflorescência marcada com fita colorida, marcando os visitantes florais com a ajuda de um contador. Após dez minutos, trocava-se de inflorescência, sendo esta observada novamente pelo mesmo tempo. Assim sucessivamente até totalizar dez inflorescências. Os botões e flores de cada inflorescência foram contados e anotados na planilha para a análise posterior.

### *Carga polínica*

Para verificar se as abelhas coletadas poderiam ser potenciais polinizadores, montaram-se lâminas de referência com o pólen da planta de estudo e com os grãos de pólen encontrados no corpo dos indivíduos. Verificou-se igualmente a localização da carga polínica no corpo do visitante e a porcentagem de pólen de *C. minor*, utilizando-se a metodologia descrita em Bernhardt e Weston (1996).

## **Resultados**

### *Biologia floral*

As flores de *C. minor* são do tipo goela, possuem uma única pétala branca que apresenta guia de néctar amarelo. A flor é formada por cinco sépalas creme, quatro pequenas dispostas na base da flor e uma de maior tamanho cobrindo os verticilos reprodutivos (Fig. 1). Os verticilos reprodutivos consistem em um pistilo e uma antera com abertura ramosa/longitudinal. Os verticilos reprodutivos ficam na base da pétala, sendo que esta funciona como uma plataforma de pouso para os visitantes. A flor apresenta produção de néctar em um pequeno tubo na base do cálice, o calcar, estrutura característica da família Vochysiaceae. O volume e quantidade de açúcar do néctar variou de 2,4  $\mu$ l e 0,2162 mg de açúcar em botões ensacados, 2,6  $\mu$ l e 0,2162 mg em botões livres e 1,1  $\mu$ l e 25,0 mg em flores abertas.

**Figura 1** - Morfologia floral e hercogamia em flores de *Callisthene minor* Mart. no povoado de São Jorge, Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, estado de Goiás, Brasil. A) flor tipo goela de *C. minor* com uma grande pétala com guia de néctar e uma sépala que protege as estruturas reprodutivas; B) Estruturas reprodutivas formada por uma única antera e um pistilo; C) Hercogamia ou separação espacial da antera e do pistilo com a flor ainda em botão



Às 5:30h da manhã a antese floral se inicia, as anteras começam a liberar o pólen e o estigma está igualmente receptivo antes da completa abertura da flor. As flores estão completamente abertas às 6:00h da manhã, contudo foi observado que o horário de antese pode variar de acordo com a temperatura do ambiente. Em dias mais frescos, o horário da antese variou de 6h às 7h da manhã. As flores duram entre 12 e 24 horas, com mudanças na coloração da pétala de branco para creme e uma completa senescência.

A espécie é caracterizada por uma assimetria interfloral, com flores apresentando dois tipos morfológicos em um mesmo indivíduo. Os tipos morfológicos são identificados de acordo com a posição do pistilo da flor em relação ao eixo floral: um tipo possui o pistilo posicionado a direita (*right flowers*) em relação ao eixo floral, enquanto no outro o pistilo está posicionado a esquerda (*left flowers*), caracterizando esta espécie como enantiostílica. Os dois tipos florais estão distribuídos nos indivíduos sem nenhum arranjo particular (enantiostílica monomórfica), com os dois tipos ocorrendo na mesma inflorescência, com uma razão de 1.01: 1 para cada tipo no mesmo indivíduo.

### *Estrutura floral*

As flores de *C. minor* são hermafroditas, com estigma receptivo e antera liberando polén antes da completa abertura da flor. Contudo, estruturalmente a autopolinização não ocorre devido à separação espacial dos verticilos reprodutivos (hercogamia), mesmo com a flor ainda em botão (Fig. 1). A superfície estigmática está posicionada atrás da abertura da antera. Com um teste simples, simulamos a entrada do polinizador na flor e verificamos que a polinização só é possível entre intermorfos (*left and right flowers*) com possibilidade de ocorrer geitonogamia (Fig 2).

**Figura 2** - Hecogamia e enantiostilia em *Callisthene minor* Mart. no povoado de São Jorge, Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, estado de Goiás, Brasil. A e B) Simulação da visitação na flor do tipo "right" de *C. minor* e a separação espacial entre o estigma e a abertura da antera. C) Simulação da entrada do visitante floral na flor tipo "left". Note que o estigma contata apenas a mancha de pólen deixada no grafite pela flor tipo "right" (círculo vermelho). A sépala circutada foi retirada nos dois tipos florais para a visualização das estruturas reprodutivas



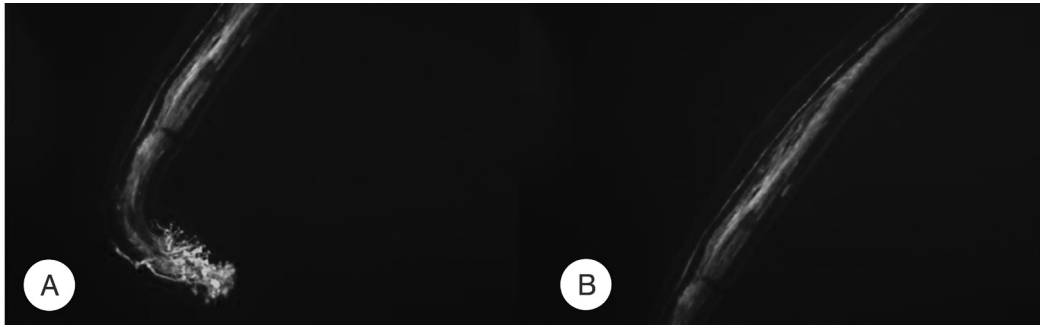
### *Sistema Reprodutivo*

Foram verificadas alterações morfológicas nos pistilos submetidos aos experimentos de cruzamento xenogâmico e geitonogâmico. No experimento de polinização por geitonogamia, cerca de 14 flores, das 15 originalmente submetidas ao experimento de polinização apresentaram o ovário dilatado (uma flor caiu). Nos experimentos de xenogamia, 11 flores, das 15 originalmente submetidas ao experimento de polinização, apresentaram o ovário dilatado (quatro flores caíram).

Um total de dez pistilos para xenogamia e cinco para geitonogamia estavam aptos para análise em microscopia de fluorescência. Dos dez pistilos analisados para experimentos de xenogamia, cinco apresentaram tudo polínico atingindo o ovário e um apresentou tubo, mas sem atingir o ovário. Ainda no mesmo experimento, dois pistilos não apresentaram crescimento de tubo polínico e em dois não foi possível verificar devido a danos no ovário. Para o experimento de geitonogamia, um pistilo apresentou tubo polínico até o ovário (Fig.

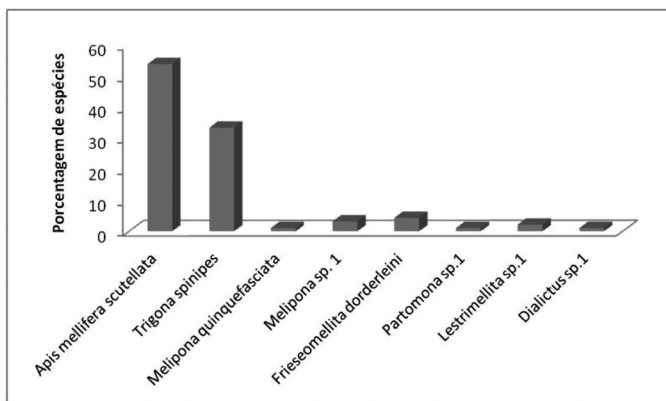
3), três apresentaram tubo sem atingir o ovário e em um, devido a danos no pistilo, não foi possível a verificação.

**Figura 3** - Fotografia de fluorescência de estigma e estilete submetido ao tratamento de geitonogamia em flor de *Callisthene minor* Mart. (A) tubos polínicos germinando no estigma; (B) tubo polínico através do estilete



### Visitantes Florais

Durante os três dias do trabalho observou-se um total de 93 abelhas, pertencentes a oito espécies diferentes. Dentre as mais encontradas destaca-se a presença de *Apis mellifera scutellata* (53,7%), seguida de *Trigona spinipes* (33,3%), *Frieseomellita dorderleini* (4,3%), *Melipona sp.1* (3,2%), as espécies *Melipona quinquefasciata*, *Partomona sp.1*, *Lestrimellita sp.1* e *Dialictus sp.1* apresentaram abundância igual ou inferior a 2% (Fig. 4).

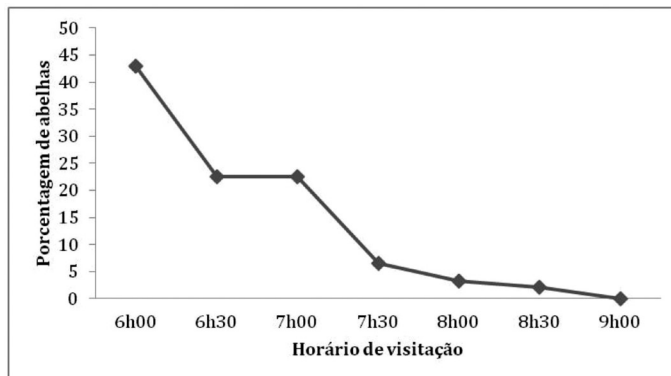


**Figura 4** - Riqueza e abundância de espécies de abelhas encontradas visitando flores de *Callisthene minor*, Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brasil

As observações e coletas dos potenciais visitantes florais iniciaram-se no primeiro dia do trabalho às 6h da manhã, no início da antese da flor. O maior pico de visitação encontrase no início da manhã, regredindo até às 9h, quando já não encontramos nenhum inseto visitando as flores (Fig. 5). Após o término da visitação podemos notar que as flores já começavam a perder a atratividade para os insetos.

A taxa de visitação calculada resultou em 0,02 visitante/flor/10min e 1 visitante/inflorescência/10min. Esse baixo resultado pode ter sido devido às condições meteorológicas no dia em que esse experimento foi feito. Este dia de coleta foi o único a amanhecer nublado

e com temperatura inferior aos outros dias de campo, contribuindo para a diminuição no número de visitantes. Assim, consideramos que este resultado não retrata de forma fiel a visitação em *C. minor* Mart.



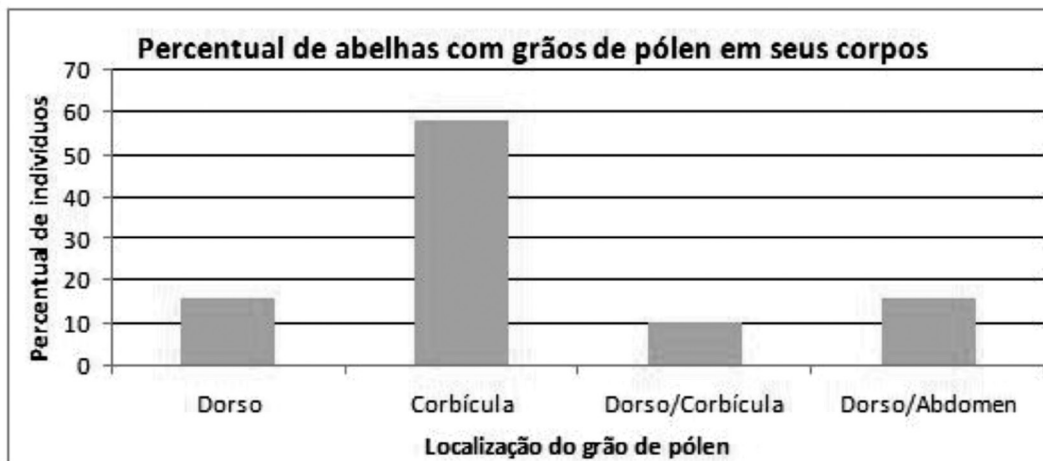
**Figura 5** - Abundância de abelhas durante o período de visitação da *Callysthene minor* Mart., Chapada dos Veadeiros, Goiás

### *Carga polínica*

Dos 18 indivíduos analisados, pertencentes a sete espécies, apenas quatro indivíduos não apresentaram pólen de *C. minor*. Estes indivíduos pertencem às espécies *Frieseomelitta doederleini*, *Trigona spinipes*, *Apis melífera* e *Trigona truculenta*. Contudo, indivíduos destas mesmas espécies possuem carga polínica com pólen de *C. minor*. Indivíduos das espécies *Dialictus* sp., *Apis melífera*, *Paratomoa* sp. e *Trigona spinipes* apresentaram carga polínica com 100% de pólen proveniente de *C. minor*. As cargas polínicas das outras espécies e indivíduos apresentaram percentual de pólen de *C. minor* variando de 3% a 99%.

A posição da deposição de pólen de *C. minor* no corpo dos visitantes variou entre corbícula, dorso e abdômen (Fig. 6). Não houve distinção quanto à deposição de pólen entre o lado direito e esquerdo do corpo do visitante.

**Figura 6** - Percentual de abelhas com grãos de pólen nas diferentes partes do seus corpos, Chapada dos Veadeiros, Goiás





## Discussão

Os dados apresentados neste trabalho apontam que a enantiostilia apresentada pela espécie *C. minor* apesar de evitar autopolinização, não evita geitonogamia. Contudo, estes mesmos dados não podem ser considerados conclusivos, uma vez que a formação de fruto não foi acompanhada. Apesar de ter sido verificado que tubos polínicos atingem o ovário nos experimentos de geitonogamia para a espécie *C. minor*, foi descrito que nas espécies de Vochysiaceae dos gêneros *Qualea* e *Callisthene*, o sistema reprodutivo descrito é o de autoincompatibilidade tardia (OLIVEIRA, 1998), podendo ser o sistema reprodutivo da espécie em estudo. A autopolinização espontânea é dificultada pela própria morfologia da flor, com o pistilo posicionado atrás da abertura das anteras e atestada também no experimento de simulação de entrada do visitante (Fig. 2).

O papel da enantiostilia para potencializar reprodução cruzada não é consenso. Barret *et al.*, (2000) explicam que outras forças podem estar envolvidas nesta adaptação como, por exemplo, o aumento do *fitness* das flores masculinas em flores com enantiostilia. Esta adaptação evitaria a perda de pólen no estigma da flor de origem (autopolinização) promovendo uma melhor dispersão polínica. A enantiostilia é comum, notoriamente espécies com anteras poricidas, como leguminosas da tribo *Cassinae*. Neste grupo esta condição foi relacionada à necessidade do deslocamento das anteras de alimentação para liberar o acesso às abelhas e ao mesmo tempo deslocar estas para longe do estigma, para que espécies vibradoras não o danificassem (DULBERGER, 1981). Uma segunda hipótese, também relacionada a espécies com heteranteria e poricidas, é a de Westercamp (2004) em que a enantiostilia seria resultado da necessidade de deposição do pólen em locais não facilmente acessíveis a abelha, nas laterais do corpo.

Contudo, *C. minor* não se encaixa nas hipóteses de evolução de enantiostilia associada a flores heteranteras e polinizada por abelhas vibradoras. Assim podemos reconhecer que para esta espécie a asserção de Barret *et al.*, (2000) é a mais provável, de que ao evitar autopolinização pela posição das suas estruturas reprodutivas (enantiostilia), a dispersão polínica pode ser potencializada por, a princípio, dificultar a deposição do pólen no estigma da mesma flor de origem. Entretanto, a geitonogamia ocorrida nesta espécie pode causar exatamente o efeito oposto. Ela pode reduzir as chances de dispersão polínica (*male fitness*), uma vez que o pólen de um mesmo indivíduo competiria na superfície estigmática com grãos de pólen compatíveis (*cross pollen*) de outro indivíduo (JONG *et al.*, 1993). Caso esta espécie, como outras da família Vochysiaceae, possua auto-incompatibilidade tardia (OLIVEIRA, 1998), a ocorrência de geitonogamia diminui ainda o sucesso reprodutivo feminino reduzindo a produção de sementes, uma vez que não há desenvolvimento de frutos (JONG *et al.*, 1993).

A espécie *C. minor* é polinizada por abelhas pequenas em busca de néctar (OLIVEIRA, 1998), sendo a quantidade deste recurso relativamente pequena variando de aproximadamente 1 a 2,6  $\mu$ l.

Este baixo volume de néctar pode ser apontado como uma possível explicação para as reduzidas taxas de visitantes florais que devido a isso, aumentariam o tempo de visitação em uma mesma inflorescência na mesma planta e com isso, talvez incrementando as chances de geitonogamia na espécie.

O debate sobre quais forças evolutivas influenciaram o aparecimento e manutenção da enantiofilia em angiospermas depende de mais estudos básicos sobre polinização e sistemas reprodutivos, especialmente em espécies enantiofilicas não relacionadas a polinização por vibração e heteranteria.

## Referências

BARRETT, S. C. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*, n. 3, p. 274-84, 2002.

BERNHARDT, P.; WESTON, P. H. The pollination ecology of *Persoonia* (Proteaceae) in eastern Australia. *Telopea*, n. 6, p. 775-804, 1996.

BUCHMANN, S. L. Buzz Pollination in Angiosperms. In: JONES, C. E.; LITTLE, J. R. *Handbook of experimental pollination biology*. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 73-113. 1983.

DEL-CLARO, K.; TOREZAN-SILINGARDI, H. M.; BELCHIOR, C.; ALVES-SILVA, E. Ecologia Comportamental: Uma ferramenta para a compreensão das relações animais-plantas. *Oecologia Brasiliensis*, n. 13, v. 1, p. 16-26, 2009.

DULBERGER, R. The Floral Biology of *Cassia didymobotrya* and *C. auriculata* (Caesalpinaceae). *American Journal of Botany*, n. 68, p. 1350-1360, 1981.

ENDRESS, P. K. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge: Cambridge University Press, 499p. 1994.

JONG, T. J. DE.; WASER, N. M.; KLINKHAMER, P. G. L. Geitonogamy: The neglected side of selfing. *Trends in Ecology and Evolution*, n. 8, v. 9, p. 321-325, 1993.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. *Techniques for pollination biologists*. Niwot: University Press of Colorado, 583p. 1993.

OLIVEIRA, P. E. A. M. Reproductive Biology, Evolution And Taxonomy of The Vochysiaceae In Central Brazil. In: OWENS, S.; RUDALL, P. *Reproductive biology 96: in systematics, evolution and economic botany*. London: Royal Botanic Gardens at Kew, 1998. p. 381-393.

WESTERKAMP C. Ricochet pollination in Cassias – and how bees explain enantiofilia (Preliminary Communication). In: FREITAS, B. M.; PEREIRA, J. O. P. *Solitary Bees: Conservation, Rearing and Management for Pollination*. Fortaleza: Federal University of Ceará, 2004. p. 225-230.

WILLMER, P. *Pollination and Floral Ecology*. Princeton: Princeton University Press, 2011.



# Comparing traditional and strategic pan trapping effectiveness in assessing bee biodiversity in the Brazilian Cerrado

Étienne Normandin<sup>1</sup>  
Daniel Wiens<sup>2</sup>

Pollination is undoubtedly one of the most important ecosystem services provided by animals. Animals are estimated to pollinate over 85% of flowering plant species worldwide (OLLERTON *et al.*, 2011, WINFREE, 2010) and the conservation of their biodiversity ensures the reproduction of many wild plants (WESTPHAL *et al.*, 2008). Several factors such as habitat fragmentation, loss of species, prevalence of invasive species and pesticides were determined to be the causes of the decline of pollinators. In the recent years, there has been more concern about this potential decline regarding the richness and abundance of bees (COMMITTEE ON THE STATUS OF POLLINATORS IN NORTH AMERICA, 2007). These concerns have led to an increase in effort to monitoring bee fauna since they are the most important group of pollinators worldwide (MITCHENER, 2000). However, studies have had difficulty producing population trends in bee communities in order to predict the future decline path of bee populations (WESTPHAL *et al.*, 2008). We need standardized monitoring schemes to assess this suggested deterioration of bee communities because evidence of this ongoing decline has been questioned (GHAZOUL, 2005). This has shown a lack of systematic monitoring programs and efficiency for pollinators. Bees show fluctuations in their population, or different activity peaks, on a seasonal and yearly basis (ROUBIK, 2001). There is even species differences in relation to the height from which they are sampled (TUELL; ISSACS, 2009).

Some passive methods have been employed largely in studies of pollinator sampling and bee diversity, and pan traps are one of the most common methods. This traditional method consists of placing a pan trap on a transect in a random location of a given site. This gives the trap suitable data for statistical analysis (DAFNI *et al.*, 2005). This passive method is viewed as an effective way for researchers to collect bees because it is cheap, requires little time, samples bees abundance efficiently (WILSON *et al.*, 2008) and supposedly diminishes collector biases (WILSON *et al.*, 2008). For these reasons, pan traps have been

---

<sup>1</sup> McGill University (etienne.normandin@gmail.com)

<sup>2</sup> University of saskatchewan (djwt343@mail.usask.ca)

widely used without question as a unique and easy way of sampling local bee communities (CANE *et al.*, 2000). However, some studies have taken precaution against using pan traps to estimate bee richness (CANE *et al.* 2000, TOLER *et al.*, 2005; ROULSTON *et al.*, 2007). In fact, pan traps can be subject to taxonomical bias in the way that they catch preferentially small-bodied bees and may under sample large bee species (CANE *et al.*, 2000; ROULSTON *et al.*, 2007). The height of the pan trap also demonstrated that some groups of bees have different foraging behaviours and they are found to have better richness and numbers at a certain height (TUELL; ISAAC, 2008; GUMBERT; KUNZE, 1999). Pan trap effectiveness may also decrease with the increase of floral resources (BAUM; WALLEN, 2011). Net collecting is accepted as the best method for collecting bee richness and abundances and this method is known to capture bees that specialize in pollinating certain flower species (CANE *et al.*, 2000), but collector effort is much greater compared to pan traps (NIELSEN *et al.*, 2011). However, many bees forage on flowering trees, and netting them becomes a hard task for collectors, so this may not be effective in terms of time consumption (TUELL; ISAAC, 2008).

In Brazil, this is the case where in September, when the habitat of the Cerrado is very dry, the majority of flowers are in the tree canopies. The flowers are scattered and are very patchy in the dry season (OLIVIERA; GIBBS, 2002). In this kind of environment, it is difficult to properly assess the bee community with only hand netting. More strategic methods have been investigated by Tuell and Isaac (2008), where they found that placing pan trap at different height will successfully capture a variety of different bee species. They also found that the match of pan trap colour with the flower colour was not significantly different than other colours. However, no study tested the matching of pan trap colour with flower colour inside a flower patch, as within the canopy of a tree is a better method of pan trapping. As a strategic method compared to a traditional method, the pan trap colour and location matching of a flower patch could add several advantages such as luring the bees by using the same pan trap colour, at the same height of the flowers, in a flower patch, to benefit the frenetic behaviour of bees. We suggest that this matching will limit the distinction of the bee between a pan trap and a flower. Perhaps, assessing bee communities with a more strategic method could better catch bee abundances and richness, therefore will better help producing population trends. Our objective was to determine whether strategically-placed pan-traps or traditional pan-trapping methods are more effective to assess bee richness in the Cerrado. We anticipate that strategic placement of pan traps in a flower patch will catch a bigger richness in bees. As well, we think the pan colour that is best matched with the flowers would trap more bee species than traditional pan trapping.

## Materials and Methods

The study took place in the Chapada dos Veadeiros National Park, in Alto Paraíso, Goiás. This part of central Brazil is in the middle of the Cerrado biome, which is a neo-tropical savannah rich in biodiversity. The Cerrado is characterized by highly seasonal fires and

precipitation, as well as nutrient poor soils. The study took place September 18-20, 2012, at the end of the dry season. Weather throughout the study consisted of temperatures exceeding 25°C, no precipitation and little to no cloud cover during the day.

In order to test our hypothesis, three different types of trees were sampled. Identification of the tree types was based primarily upon their flower colour (pink, purple and white), as well as using the trees' general characteristics (Fig. 1). Two trees per flower colour were sampled by using six plastic pan-traps per tree, resulting in a total of 36 pan-traps being used. Half of the traps for each tree were placed close to the ground on approximately 30 cm tall bamboo (*Poaceae*) stakes, while the remaining three were raised into the canopy amongst the trees' inflorescences. The traps placed at the flowers' height were tied to the tree using twine and hung off the branches within the range of distances for which the natural inflorescences were found from that same branch. When the flower-level traps were lowered to collect their captured insects, they were contained within an insect net, which had been extended with a bamboo pole. In this way, insects were not lost if the pan-traps swayed during their descent.



**Figure 1** - The three types of flowers on the vegetation used in this study, from left: pink, purple and white

The ground-level traps were placed twenty meters away from the sampled tree, and were placed on the stakes to avoid small mammals and reptiles that may have foraged in the pan for insects and water. Trees' ground and flower-level pan traps also varied in colour, consisting of a blue, white, and yellow trap at each of the two heights for all six trees. The traps were filled with soap water, and left active for 36 hours before being emptied. The traps were checked once during the experiment to ensure all the water had not evaporated or been spilled due to high winds; however this was not a problem.

Once the trapping was complete, the bees were sorted, washed, and pinned. Identification of the bees was completed by a specialist. Once the number of each bee species from each trap was determined, the results were analyzed using several methods, including an ANOVA (analysis of variance) to determine the effect of trap height on the captured bee abundance.

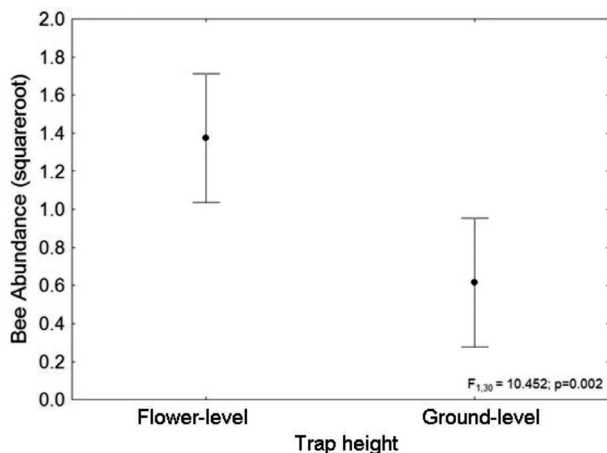
To find the average number of species found per number of individuals, a rarefaction analysis was completed. The last analysis performed was a factorial ANOVA, which was used to identify the effects of pan-trap height and flower colour on species richness.

## Results

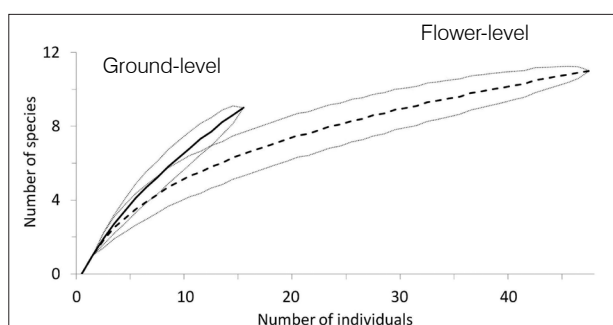
A total of 15 bee species were trapped in this study, 6 from only the flower-level traps, 4 from only the ground level traps, and 5 species that were captured by both trap types (Tab. 1). The total number of trapped bees was 62. An ANOVA test comparing the bee abundance trapped by the two different methods found that significantly more bees were found using the flower-level traps ( $F = 10.5$ ,  $p = 0.002$ ), and that their 95% confidence intervals did not overlap at all (Fig. 2). A rarefaction analysis of this same data showed that despite the flower-level traps yielding both more bee species and more bees, the number of species found per number of individuals was significantly higher for the ground-level traps (Fig. 3). The standard deviation of the curves presented in figure 3 overlap at the curves' bases, however there is no longer any overlap as the curves extend.

**Table 1** - The species of bees collected from pan-traps set near the ground or level with nearby inflorescences

Species	Ground-level	Flower-level
<i>Apis mellifera</i>	0	4
<i>Augochlora</i> sp. 1	2	0
<i>Augochlora</i> sp. 2	1	0
<i>Augochlora</i> sp. 3	0	1
<i>Augochloropsis</i> sp. 2	0	1
<i>Ceratina</i> sp. 1	5	3
<i>Ceratina</i> sp. 2	0	1
<i>Dialictus</i> sp. 1	1	0
<i>Dialictus</i> sp. 2	1	2
<i>Euglossa</i> sp. 3	0	1
<i>Geotrigona</i> sp. 1	0	1
<i>Halictus</i> sp. 1	1	5
<i>Lithurgus lithurgus</i>	1	0
<i>Paratrigona lineata</i>	2	11
<i>Trigona spinipes</i>	1	17

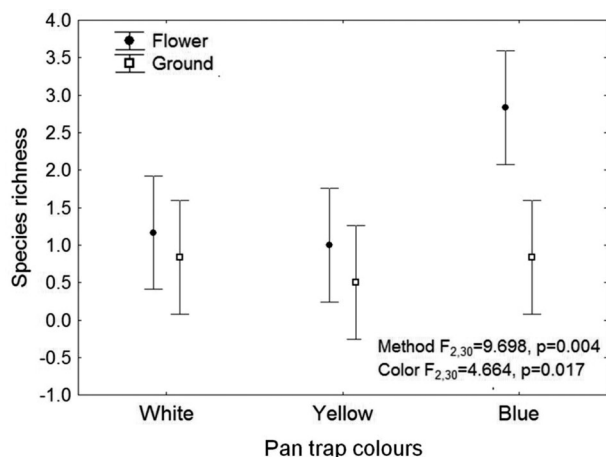


**Figure 2** - ANOVA test comparing the square-root of the abundance of bees trapped in pans near the ground or level with flowers



**Figure 3** - A rarefaction of the bee species per number of individual bees trapped, for both the flower-level (dashed line) and ground-level (solid line) traps

In the final figure, the correlation between the species richness of the trapped bees and its connection to the each trapping method was examined using a factorial ANOVA (Fig. 4). This comparison was also broken down by the three colours of pan traps used. For the yellow and white pan-traps, no difference in species richness was found for the flower-level and ground-level traps. For blue pan-traps however, a significant difference was found in that blue traps placed at flower-level yielded a greater species richness than the blue ground-level traps (Trap height:  $F = 9.69$ ,  $p = 0.004$ ; Color:  $F = 4.66$ ,  $p = 0.017$ ).



**Figure 4** - A factorial ANOVA of pan trap colour and trapping method compared with the number of trapped bee species



## Discussion

Throughout this research, the differences in effectiveness for ground and flower-level pan-traps to capture bee species in the Brazilian Cerrado have been compared. The results suggest that both sampling methods have different weaknesses and advantages in their ability to sample bees. Similar studies may yield additional conclusions, as the present study was seriously limited in the sampling period, area surveyed, and the number of replicates. However, this research, in addition to related research that has become more prevalent in the past few years, may still provide clues as to what the future of bee sampling techniques will hold.

The comparison of bee sampling techniques begins with an examination of the total number of species captured by each pan-trapping method. The traps placed at the height of flowers yielded 50% more unique species (found in only one type of trap) than the traps placed near the ground (Table 1). This trend was further explored using an ANOVA, where the square root of abundance of bees sampled was significantly higher for the flower-level traps (Fig. 2). Previous studies have also found a greater richness of bee species caught in pan traps placed in the flowering canopy (TUELL; ISAACS, 2008). Regardless of the canopy height, the improved capture of many bees is consistently encountered when the traps are placed at the height of the flowers (CANE *et al.*, 2000, TUELL; ISAACS, 2008; WESTPHAL *et al.*, 2008). This greater trapping effectiveness has been suggested to occur due to the bee's tendency to forage on flowers along a horizontal stratum (CANE *et al.*, 2000, GUMBERT; KUNZE, 1999; WADDINGTON, 1979), which seems a likely explanation for our findings as well.

Although the total number of unique species captured was still quite low ( $n = 15$ ), a relatively large number of species were only caught by traps at one height. Six species were trapped by only flower-level traps, and another four by only the ground-level traps. Species caught by traps at only one particular height numbered twice that of the total number of species which had individuals caught by traps placed both near the ground, and traps level with the flowers ( $n = 5$ ) (Tab. 1). An increase in the overlap between the bees species caught at each sampling height would be expected if the present study had run longer, and been larger in scope, however the trend of many bees being found at only one trap height would still be expected. Other studies have also found a large proportion of species exclusively from one sampling method, such as 34.5% of 267 species (7697 individuals) being found exclusively in either trap nests, observation plots, transect walks, or pan traps (NIELSEN *et al.*, 2011). This suggests a need for multiple trapping methods, however this is not always possible due to constraints on time, and the distance required to be travelled between sample locations. So far then, it would seem if pan-traps are used, they would be more effective if placed at the height of local flower patches; however, this increased effectiveness may come at the cost of efficiency.

While the flower-level traps caught both more bee individuals and species, the rarefaction analysis showed that these traps caught fewer species per number of trapped bees (Fig. 3). Although trapping bees is the aim of using the traps, it does not further a measurement of richness when bees of one or two species are trapped in great numbers. Thus, the number of bees killed unnecessarily by the flower-level traps may be considered a detriment to this method, although this problem appears to stem from the pan-trap method in general. Larger studies using ground-level traps also capture a large number of a few species of bees (WILSON *et al.*, 2008), however this affect is stronger in traps at flower-level (TUELL; ISAACS, 2008). In addition to flower-level traps catching excess numbers of a few bee species, if the patterns shown in figure 3 were to continue, the trapping of a greater abundance of bees by the flower-level traps would not be expected to capture many more species, as the curve appears to reach a horizontal asymptote. In contrast, the ground-level traps' curve would peak at a much greater number of captured species if the curve were to continue. However, larger studies have not found this to be the case (CANE *et al.*, 2000, TUELL; ISAACS, 2008), so the slope of figure 3's rarefaction curves may just be the result of a small sample size. This could occur simply because two of the species (*Paratrigona lineate* and *Trigona spinipes*) that happened to be more attracted to the flower-level traps were social bees and so were caught in much larger numbers than any of the other bees in this study (Tab. 1). Together with those caught in the pan-trap, half of bees caught in this study were *P. lineate* and *T. spinipes*.

Changing the height of the trap appears to alter not only the complement of bee species collected, but also the frequency in which bees common to both trap heights are found. This difference in bee species and abundance has also been found between pan traps and sweep netting (WILSON *et al.*, 2008). The variation in bee species abundance among sampling methods brings into question how accurate any single trapping method is at measuring richness, since differences are found between bees caught in pan-traps at different heights, sweep netting, as well as trap nests (KRUG; ALVES-DOS-SANTOS, 2008). Even within pan trapping, there are often differences found between traps of different colours.

In our study, it was found that blue pan-traps caught the greatest number of bee species, but only when placed at the level of the inflorescences (Fig. 4). This may be due to the use of trees with purple flowers in the study, however, plants with white flowers were also chosen, and the white pan-traps did not exhibit any increase in the trapped bee richness for those traps level with the flowers. In a study by Cane *et al.*, (2000), more bee species were caught with blue pan-traps as well, despite floral blooms being predominately yellow in the sampled area. Unfortunately, the chosen flower colours in the present study could not be examined for any relationship with the bee richness caught by the pan-traps of the same colour, as the small quantity of data did not allow for this particular statistical examination. There are other who have also found of a greater number of bee species being caught by blue pan-traps (GRUNDEL *et al.*, 2011; STEPHEN; RAO, 2005), however the difference is not always statistically significant, and within each of these studies there were many species which preferred each of the available colors. Therefore, it would seem prudent to use all three

colors to accommodate the variable preferences of bees, even if one trap colour might be slightly more effective. But what conclusions can we draw about other variations between the types of traps for sampling bee?

From information yielded by the present study, as well as many past studies, it would appear that the more variety in the sampling techniques used in a single study, the better. The use of pan-traps, trap-nests, scent-baited traps, malaise traps, netting along transects, and observation-plots have all caught unique species when used in studies of bee richness and biodiversity (BARTHOLOMEW; POWELL, 2005; KRUG; ALVES-DOS-SANTOS, 2008; NIELSEN *et al.*, 2011). Even within the pan-trapping technique, the use of multiple color pans (TOLER *et al.*, 2005), and placing the pans at different heights (TUELL; ISAACS, 2009) increases the total bee richness captured. Unfortunately, it is seldom practical or economical to deploy every bee sampling technique. Although the study size was small, our results suggest that flower-level pan traps are the most effective, despite drawbacks such as the large number of a few, common species which are caught, as well as the increased amount of time and effort it takes to set-up and check the traps. The authors believe that additional time spent setting up pan-traps in vegetation could be greatly alleviated with the proper tools, a standardized method for placing pan-traps amongst flowering vegetation, and more experience in placing the traps.

While the results of the current study are from the Brazilian Cerrado, there is evidence that this method can be quite successfully used across a great variety of geographical regions and habitats (WESTPHAL *et al.*, 2008). By placing the pan-traps at the approximate height of existing floral patches, the traps can remain effective regardless whether they are located in fields or forests, tropics or taiga. As well, by placing the traps both level with and among the flowering vegetation, the pan-traps may no longer be susceptible to the competition that naturally occurring flowers seem to provide (BAUM; WALLEN, 2011; WILSON *et al.*, 2008). So, despite limitations such as a greater number of individuals trapped per species found, and a potentially greater difficulty in setting up the pan-traps, this study has found placing pan-traps at the height of local flowering vegetation to be more effective for measuring the richness of bee species in an area, compared to when the traps are always placed near the ground.

Further testing would be of use to identify whether this technique is more effective all around the globe, compared to the widespread method of placing the traps on or near the ground. Like the sampling of bees, many methods of sampling insects may have been carried on from previous times without adequate testing of their ability to effectively measure species richness, abundance and diversity. As technology advances and biological research continues, an increasing number of options for sampling and processing sampled insects are becoming available. Hopefully, these advancements will spur a persistent re-examination of sampling techniques, so that studies of species' presence and abundance can be as accurate as possible for future policy makers and interested private citizens alike.

## Acknowledgements

Thanks to Dr. Favízia Freitas de Oliveira for the identification of bee species, Felipe Amorim and Daniel de Paiva Silva for their assistance with the statistical analyses, and Dr. Peter G. Kevan for guidance throughout this research project, which was completed as part of the International Pollination Course 2012.

## References

- BARTHOLOMEW, C.; PROWELL, D. Pan compared to malaise trapping for bees (Hymenoptera: Apoidea) in a longleaf pine savanna. *Journal of the Kansas Entomological Society*, n. 78, v. 4, p. 390-392, 2005.
- BAUM, K. A.; WALLEN, K. E. Potential bias in pan trapping as a function of floral abundance. *Journal of the Kansas Entomological Society*, n. 84, v. 2, p. 155-159, 2011.
- CANE, J.; MINCKLEY, R.; KERVIN, L. Sampling bees (Hymenoptera: Apiformes) for pollinator community studies: pitfalls of pan-trapping. *Journal of the Kansas Entomological Society*, n. 73, v. 4, p. 225-231, 2000.
- COMMITTEE ON THE STATUS OF POLLINATORS IN NORTH AMERICA. *Status of pollinators in North America*. Washington D.C.: The National Academies Press, 2007.
- DAFNI, A; KEVAN, P. G.; HUSBAND, B. C. *Practical pollination biology*. Cambridge: Environquest, 2005. p. 590.
- GHAZOUL, J. Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Trends in Ecology and Evolution*, n. 20, p. 367-373, 2005.
- GRUNDEL, R.; et al. Effectiveness of bowl trapping and netting for inventory of a bee community. *Environmental Entomology*, n. 40, v. 2, p. 374-380, 2011.
- GUMBERT, A.; KUNZE, J. Inflorescence height affects visitation behavior of bees—a case study of an aquatic plant community in Bolivia. *Biotropica*, n. 31, v. 3, p. 466-477, 1999.
- KRUG, C.; ALVES-DOS-SANTOS, I. The use of different methods to sample the bee fauna (Hymenoptera: Apoidea), a study in the mixed temperate rainforest in Santa Catarina State. *Neotropical Entomology*, n. 37, v. 3, p. 265-278, 2008.
- MITCHENER, C. D. *The bees of the world*. Baltimore: John Hopkins University Press. 2000.
- NIELSEN, A.; STEFFAN-DEWENTER, I.; WESTPHAL, C.; MESSINGER, O.; POTTS, S. G.; ROBERTS, S. P. M.; SETTELE, J. Assessing bee species richness in two Mediterranean communities: importance of habitat type and sampling techniques. *Ecological Research*, n. 26, v. 5, p. 969-983, 2011.

- OLIVIERA, P.; GIBBS, P. Pollination and reproductive, biology in Cerrado plant communities. The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna, p. 329-348, 2002.
- ROUBIK, D. W. Ups and downs in pollinator populations: When is there a decline? *Conservation Ecology*, n. 5, v. 1, p. 1-22, 2001.
- ROULSTON, T.; SMITH, S. A.; BREWSTER, A. L. A Comparison of Pan Trap and Intensive Net Sampling Techniques for Documenting a Bee (Hymenoptera: Apiformes) Fauna. *Journal of the Kansas Entomological Society*, n. 80, v. 2, p. 179-181, 2007.
- STEPHEN, W.; RAO, S. Unscented color traps for non-Apis bees (Hymenoptera: Apiformes). *Journal of the Kansas Entomological Society*, n. 78, v. 4, p. 373-380, 2005.
- TOLER, T.; EVANS, E.; TEPEDINO, V. Pan-trapping for bees (Hymenoptera: Apiformes) in Utah's west desert: the importance of color diversity. *Pan-Pacific Entomologist*, n. 81, v. 3/4, p. 103-113, 2005.
- TUELL, J. K.; ISAACS, R. Elevated pan traps to monitor bees in flowering crop canopies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 1, n. 131, p. 93-98, 2009
- WADDINGTON, K. Divergence in inflorescence height: an evolutionary response to pollinator fidelity. *Oecologia*, v. 1, n. 40, p. 43-50, 1979.
- WESTPHAL, C.; BOMMARCO, R.; CARRÉ, G. Measuring bee diversity in different European habitats and biogeographical regions. *Ecological Monographs*, v. 4, n. 78, p. 653-671, 2008.
- WILSON, J.; GRISWOLD, T.; MESSINGER, O. Sampling bee communities (Hymenoptera: Apiformes) in a desert landscape: Are pan traps sufficient? *Journal of the Kansas Entomological Society*, v. 3, n. 81, p. 288-300, 2008.
- WINFREE, R. The conservation and restoration of wild bees. *Annals of the New York Academy of Sciences*, p. 169-197, 2010.

# Heterostilia atípica em *Rourea induta* Planch. (Connaraceae) em uma área de cerrado sentido restrito no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brasil

Ebenézer Barbosa Rodrigues<sup>1</sup>  
Raphael Matias da Silva<sup>2</sup>  
Túlio Freitas Filgueira de Sá<sup>3</sup>  
Caio César de Azevedo Costa<sup>4</sup>

O Cerrado é formado por várias formações vegetacionais, sendo considerado o segundo maior bioma brasileiro, representando 25% de todo o território do país (MYERS *et al.*, 2000; MITTERMEIER *et al.*, 2005). É a região de maior biodiversidade do planeta, e suas formações se assemelham no aspecto ecológico e fisionômico na região Neotropical, Austrália e África (RIBEIRO; WALTER, 2008). Nas últimas décadas, o cerrado vem sofrendo com o processo de antropização de suas paisagens naturais e a ocupação das mesmas, resultando em cerca de mais de 50% em áreas degradadas nesse bioma (KLINK *et al.*, 1995; KLINK, 1996; MITTERMAYER *et al.*, 1999), sendo mais reconhecido, internacionalmente, como um dos 25 *hot spots* na área de conservação (MITTERMAYER *et al.*, 1999).

A heterostilia é caracterizada como um polimorfismo floral geneticamente controlado, no qual as populações que são compostas por dois (distilia) ou três (tristilia) morfos florais exibem diferenças nas posições das anteras e dos estigmas (BARRETT, 2002). Está distribuída, até o momento, em 28 famílias botânicas (DARWIN 1877; GANDERS, 1979a; LLOYD; WEBB, 1992; BARRETT; SHORE, 2008), na qual a tristilia é representada por seis famílias, sendo elas Amaryllidaceae, Connaraceae, Linaceae, Lythraceae, Oxalidaceae e Pontederiaceae (DARWIN, 1877; GANDERS, 1979a; BARRETT, 1993). Na tristilia, o morfo brevistilo, apresenta estilete curto e um nível de antera alta e outra média, o morfo medistilo, possui anteras maiores e curtas com estilete na posição mediana, por fim no morfo longistilo o estilete ocupa uma posição longe e as anteras, media e curta na flor (WELLER, 1992).

---

<sup>1</sup> Universidade Federal de Uberlândia (ebenezerbr@hotmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Goiás (rapha-matias@hotmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Goiás (tulio\_filgueira@hotmail.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal Rural do Semi-Árido (caiocesar@ufersa.edu.br)

Em geral, as espécies heterostílicas exibem um mecanismo genético de incompatibilidade, na qual apenas os cruzamentos entre os morfos florais resultam na formação de frutos (BARRETT, 1992). Darwin (1896) mostrou em diversas espécies tristílicas citadas em seu trabalho, que o pólen das diferentes anteras se diferenciava quanto a sua incompatibilidade. Essas plantas que são consideradas autoincompatíveis também apresentam hercogamia recíproca, em que os níveis entre altura do estilete e estames têm que ser semelhantes entre os morfos opostos, embora a reciprocidade não seja exata em algumas espécies (GANDERS, 1979; KOHN; BARRETT, 1992; PASSOS; SAZIMA, 1995; RICHARDS, 1997).

Connaraceae é uma família pouco representativa, composta por plantas tropicais, suas espécies no Cerrado, comumente, são arbustivo-arbóreas, distribuídas em dois gêneros (*Rourea* e *Connarus*) e sete espécies (BAKER, 1962; MENDONÇA *et al.*, 1998). No Brasil, existe apenas um trabalho com *Rourea induta* Planch. (LENZA *et al.*, 2008), não tendo muitas informações a respeito da biologia reprodutiva da família. Com isso, o objetivo do trabalho foi analisar aspectos da biologia reprodutiva e da heterostilia de *Rourea induta* em uma área de cerrado sentido restrito no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brasil.

## Material e Métodos

### *Área de Estudo*

O trabalho foi desenvolvido em setembro de 2012 em uma área de cerrado sentido restrito no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros (PNCV) (13°51'' - 14°10'S e 47°25' - 47°42'O). O Parque possui uma área total de 65.514,73 ha e está localizado no nordeste do estado de Goiás, entre os municípios de Alto Paraíso de Goiás, Cavalcante, Colinas do Sul e Teresina de Goiás. A unidade fica a 260 km de Brasília, DF e a 480 km de Goiânia, GO. O clima da região é do tipo AW (KÖPPEN, 1948) com duas estações bem definidas: uma fria e seca de maio a setembro e outra quente e chuvosa de outubro a abril. A precipitação média anual é entre 1.200 e 1.400 mm e temperatura média anual de 20 °C (FELFILI, 2007; SILVA *et al.*, 2008).

### *Biologia floral*

Para a análise da biologia floral foram observadas as características morfológicas das flores, como a longevidade floral (n=65), receptividade estigmática (n=16), liberação (n=65) e viabilidade do pólen (n=12). O início da antese foi determinado a partir da separação das pétalas e o fim a partir da alteração em sua aparência (e.g. perda do brilho, alteração da cor e murchamento). A receptividade estigmática foi verificada em diferentes períodos durante a longevidade floral, utilizando peróxido de hidrogênio 3% (DAFNI *et al.*, 2005). A liberação de pólen foi constatada pela exposição de pólen na parede das anteras. Para a viabilidade dos grãos de pólen, botões florais em pré-antese (n=6 de cada morfo) foram coletados e

armazenados em álcool 70%. Em laboratório, as anteras dos diferentes níveis de altura e morfos florais foram macerados e corados com carmim acético 3% (RADFORD *et al.*, 1974). Posteriormente, utilizando microscopia óptica, contou-se 1000 grãos de pólen de cada flor, sendo 500 grãos de pólen para cada nível de altura das anteras presentes nas flores. A coloração do citoplasma foi utilizada como critério de avaliação da viabilidade polínica.

### *Morfometria floral*

Foram coletadas 30 flores de cada morfo floral, sendo armazenadas em álcool 70% e, posteriormente, em laboratório, fotografadas em esteromicroscópio. As imagens dos órgãos sexuais (estames e pistilos) da espécie em estudo foram analisadas e mensurados utilizando o software de análise de imagem ImageJ© 1.45S.

### *Hercogamia recíproca*

O índice de reciprocidade/hercogamia de populações heterostílicas foi calculado utilizando o software RECIPROCITY (SÁNCHEZ *et al.*, 2008). Esse índice se baseia na comparação da altura das anteras de cada flor com a altura do estigma de todas as flores do morfo oposto nas populações distílicas. Quando a reciprocidade é perfeita na população analisada o índice de reciprocidade é igual à zero. Valores a partir de zero, ocorrem quando a reciprocidade não é perfeita, e são modulados pela média dos desvios padrões das diferenças de alturas. Logo, quanto maior a dispersão desses valores maior será o afastamento do valor zero (SÁNCHEZ *et al.*, 2008).

### *Isoplelia e distribuição dos morfos*

Para averiguar a razão dos morfos florais na população de *Rourea induta* foi percorrido um transecto não linear de 9764m, totalizando uma área amostral de 70648m<sup>2</sup>, utilizando-se método de varredura, no qual indivíduos em floração foram verificados quanto à manifestação do morfo floral e em seguida o indivíduo da espécie de estudo mais próximo. Posteriormente, foi realizado um teste de qui-quadrado para comparar a ocorrência dos morfos com a expectativa de ocorrência dos mesmos de 1:1 na população amostrada, considerando  $\alpha=5\%$ . Também foi aplicado o Wald-Wolfowitz *runs test*, para verificar se a sequência em que os morfos florais amostrados na população ocorreram de forma agregada ou aleatória. Os testes foram realizados usando o software estatístico Systat 10.2.

### *Sistema de incompatibilidade*

Foram realizadas observações do crescimento do tubo polínico usando a técnica de fluorescência (MARTIN, 1959) na tentativa de determinar o sistema de incompatibilidade de *Rourea induta*. Os tratamentos realizados foram de polinização intermorfo e polinização intramorfo, sendo feitas as polinizações com anteras de diferentes níveis (nível maior e nível menor separadamente para cada tratamento). Para o tratamento de polinização intramorfo, foram utilizadas apenas flores brevistilas, visto que os indivíduos longistilos não



apresentaram flores suficientes para a realização do teste. Todas as flores utilizadas foram fixadas em álcool 70% cerca de 10 horas após a polinização, sendo utilizado no mínimo oito flores e 24 pistilos por tratamento.

### *Análise polínica*

Para análise dos grãos de pólen de *Rourea induta*, botões florais dos dois morfos foram coletados em pré-antese. Os botões foram macerados e submetidos à acetólise para análise morfológica e medição dos grãos. Um total de 40 grãos de pólen, sendo que 20 de cada morfo floral foram medidos e fotografados para análise comparativa. Os dados foram expressos em média e desvio padrão analisados pelo programa estatístico SPSS, no qual após análise da normalidade por Shapiro Wilk e homocedasticidade por Levene, diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste t para amostras independentes.

### *Visitantes florais*

Os visitantes florais foram determinados por observações diretas realizadas no período das 07:00h as 12:00h e das 13:00h as 17:30h. O tempo total de observação foi de 19 horas, sendo 9:30h para cada morfo, verificando o número e frequência de visitas separadamente para os diferentes morfos florais. Os insetos visitantes foram coletados, sacrificados com câmara mortífera, montados com alfinetes entomológicos e identificados por especialistas. Foi aplicado um teste *t* de student para verificar diferenças na taxa de visitação entre os morfos florais, brevistilo e longistilo.

## **Resultados**

### *Biologia floral*

Os indivíduos de *Rourea induta* apresentaram porte arbustivo. Suas flores são actinomorfas, possuem cálice pentâmero, gamossépalo. A corola é pentâmera, dialipétala com coloração branca. O androceu é composto por 10 estames monadelfos, apresentando dois níveis de altura, sendo um grupo com cinco estames maiores e outro com cinco estames menores. O gineceu apresenta cinco pistilos apocárpicos.

As flores de *Rourea induta* apresentaram início de sua antese, no período entre as 06:30h e 08:00h ( $n=65$ ). As flores tiveram longevidade de aproximadamente 12 horas ocorrendo no final da antese o murchamento das pétalas, assim como a alteração de sua coloração ( $n=65$ ). As anteras já se encontraram deiscentes no início da antese ( $n=65$ ) e os estigmas apresentam receptividade durante todo o período da longevidade floral ( $n=16$ ). A viabilidade do pólen em flores brevistilas foi de  $98,20 \pm 1,45\%$  ( $N=6$ ) para os grãos nos estames maiores e  $97,67 \pm 1,56\%$  ( $N=6$ ) para os grãos nos estames menores. Em flores

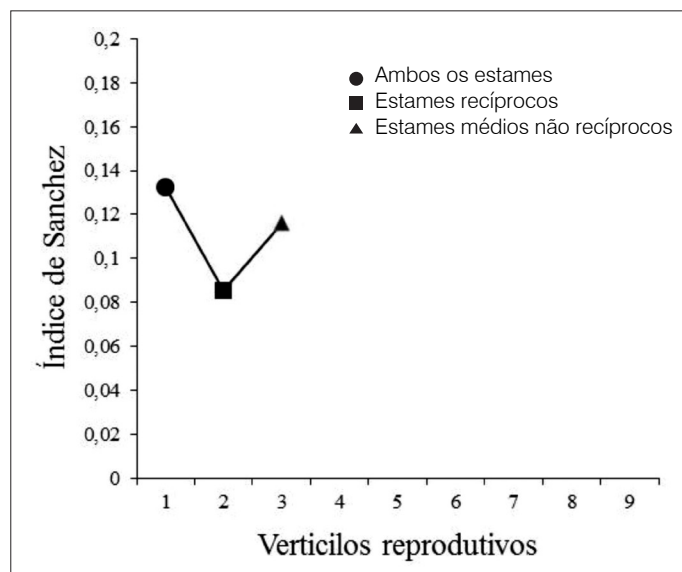
longistilas a viabilidade do pólen foi de  $98,25 \pm 2,31\%$  (N=6) e  $98,18 \pm 2,19\%$  (N=6) para os grãos nos estames em nível maior e menor, respectivamente.

### *Isopletia e distribuição dos morfos*

Foi registrada anisopletia na população estudada, sendo encontrados 43 indivíduos com flores brevistilas, 22 com flores longistilas ao longo do transecto de amostragem ( $X^2_{(0,05,1)} = 6,7$ ;  $p = 0,05$ ) e um indivíduo com flores medistilas. Houve diferenças na distribuição dos morfos brevistila e longistila ( $Z = 9999$ ;  $p < 0,001$ ). Com isso, os morfos brevistilo e longistilo ocorreram de forma agregada na área de estudo.

### *Hercogamia recíproca*

As mensurações dos órgãos sexuais demonstraram que os pistilos das flores longistilas possuem maior reciprocidade com os estames maiores das flores brevistilas. Porém, comparando o comprimento dos pistilos com os diferentes níveis de estames, houve uma maior reciprocidade dos pistilos com os estames recíprocos do que os estames não recíprocos (Fig. 1). Apesar disso, não ocorreu uma hercogamia recíproca perfeita.



**Figura 1** - Índice de reciprocidade do comprimento dos pistilos de *Rourea induta* Planch. (Connaraceae) com os diferentes níveis de estames em uma área de cerrado sentido restrito no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brasil

### *Sistema de incompatibilidade*

Em todos os testes de polinizações foi constatada presença de grãos de pólen aderidos aos estigmas. Entretanto, na maioria dos pistilos, os tubos polínicos estavam na região estigmática. Apenas em um dos tratamentos (polinização intermorfo: flores brevistilas recebendo pólen das anteras do nível maior das flores longistilas) foram observados tubos polínicos alcançando a região do ovário.

Análise polínica - O tamanho dos grãos de pólen de *Rourea induta* foram maiores em flores brevistilas, diferindo significativamente ( $P < 0,05$ ) das flores longistilas nos diâmetros polar e equatorial (Tab. 1).

**Tabela 1** - Valores de média  $\pm$  D.P das variáveis entre flores brevistilas e longistilas de *Rourea induta* Planch. (Connaraceae) em uma área de cerrado sentido restrito no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brasil

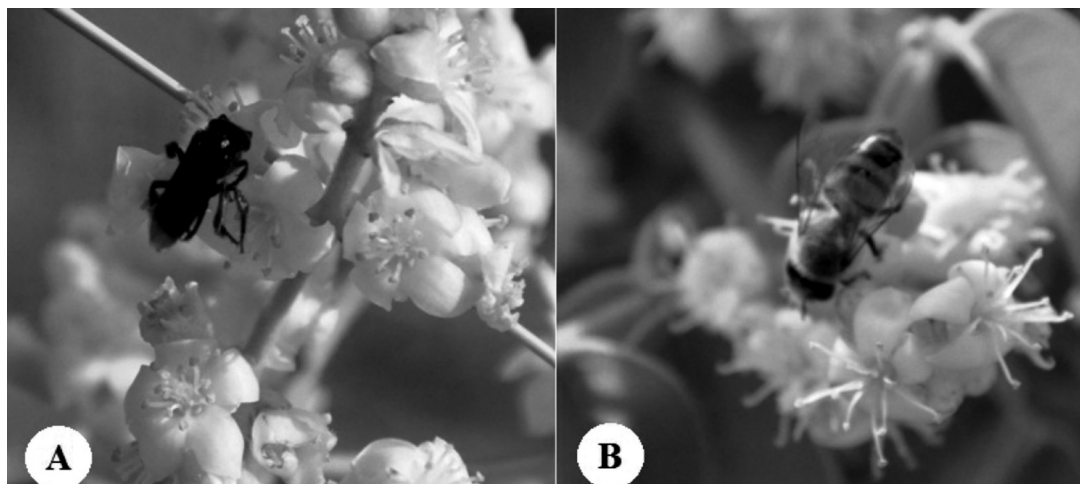
Variáveis	Brevistila	Longistila	Valor de p
Vista Equatorial	75,87 $\pm$ 8,61	65,06 $\pm$ 7,91	<0,001*
Vista Polar	72,50 $\pm$ 8,39	60,82 $\pm$ 7,48	<0,001*

\* Diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ )

### Visitantes florais

As flores de *Rourea induta* foram visitadas apenas por insetos. Foi registrado um total de 95 visitas, sendo 42 em flores brevistilas e 53 em flores longistilas (Tab. 2), não havendo diferença significativa na taxa de visitação entre os morfos florais ( $t_{(36,2)} = 0,413$   $p > 0,05$ ). Foram observados 15 espécies de visitantes distribuídos em cinco grupos, sendo representados pelas famílias e ordens: Apidae, Vespidae, Lepdoptera, Coleoptera e Formicidae. As abelhas foi o grupo que apresentou maior número de espécies (nove) e com maior frequência (67,4%), sendo *Trigona spinipes* (Fig. 2A) e *Apis mellifera* (Fig. 2B) os principais visitantes. A atividade dos visitantes florais no período matutino foi maior do que aquele observado no período vespertino nos dois morfos florais (Fig. 3).

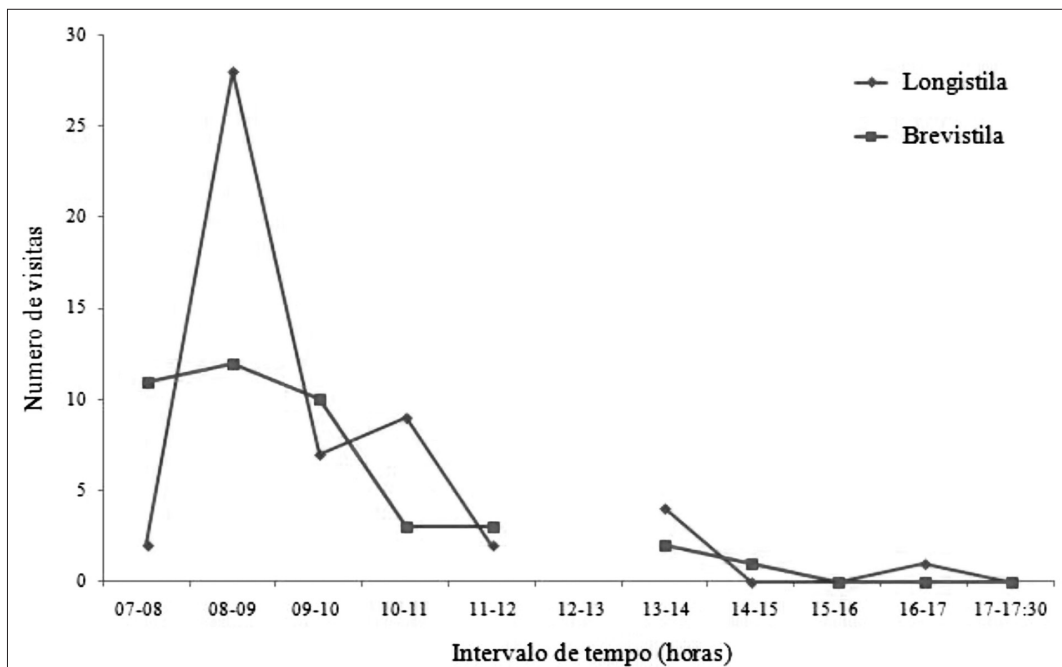
**Figura 2** - Principais visitantes florais. (A) *Trigona spinipes* (Fabricius) e (B) *Apis mellifera* Linnaeus visitando flores de *Rourea induta* Planch. (Connaraceae) em uma área de cerrado sentido restrito no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brasil



**Tabela 2** - Visitantes florais de *Rourea induta* Planch. (Connaraceae) em uma área de cerrado sentido restrito no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brasil

Grupos/Espécies	Flores Brevistilas	Flores Longistilas	Número de visitas
<b>ABELHAS</b>			
<i>Trigona spinipes</i> (Fabricius)	6	22	28
<i>Apis mellifera</i> Linnaeus	13	6	19
<i>Frieseomelitta varia</i> (Lepeletier, 1836)	1	6	7
<i>Augocheoropsis</i> sp. 1	4	4	8
<i>Augocheoropsis</i> sp. 2	0	1	1
<i>Geotrigona</i> sp.	1	4	5
Sphecidae sp.	4	0	4
<i>Xylocopa</i> sp. 1	1	0	1
<i>Xylocopa</i> sp. 2	1	0	1
<b>VESPAS</b>			
Vespidae sp.	3	2	5
<b>BORBOLETAS</b>			
Lepidoptera sp. 1	0	6	6
Lepidoptera sp. 2	2	0	2
Lepidoptera sp. 3	1	0	1
<b>BESOUROS</b>			
Coleoptera sp.	0	2	2
<b>FORMIGAS</b>			
<i>Camponotus</i> sp.	5	0	5
<b>TOTAL DE VISITAS</b>	<b>42</b>	<b>53</b>	<b>95</b>

**Figura 3** - Número de visitas por intervalo de horas pelos visitantes florais de *Rourea induta* Planch. (Connaraceae) em uma área de cerrado sentido restrito no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brasil



## Discussão

As flores de *Rourea induta* pequenas, branca, com abertura floral diurna, verticilos reprodutivos expostos, presença de pólen e néctar como recurso caracteriza a síndrome de melitofilia para tal espécie (FAEGRI; VAN DER PIJL, 1979; MOMOSE *et al.*, 1998). A antese durante o início da manhã (6:30h às 8:00h.) confirmam a proposição de Lenza *et al.*, (2008), podendo aumentar a disponibilidade de recursos aos polinizadores no período matutino. A alta viabilidade do pólen nos diferentes níveis de anteras demonstra a total funcionalidade deste sistema, mesmo dos grãos de pólen de estames não recíprocos.

Foi registrada anisopletia em *Rourea induta*, com maior proporção de indivíduos do morfo brevistila na população estudada. Contudo, Lenza *et al.*, (2008) registrou isopletia na população estudada de *R. induta* em uma área de cerrado sentido restrito na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF. Connaraceae, família a qual essa espécie pertence, possui diferentes graus na expressão da heterostilia (GANDERS, 1979a; LEMMENS, 1989). Em Connaraceae a tristilia parece ser uma característica primitiva e variações na ocorrência do sistema reprodutivo heterostílico foram encontradas, sendo essas variações consideradas como derivadas da tristilia (LEMMENS, 1989). Particularmente, o gênero *Rourea* é considerado tipicamente distílico (GANDERS, 1979b; LEMMENS, 1989). A presença de um indivíduo com flores medistilas na população estudada pode representar a possibilidade de existirem populações com tristilia em *R. induta*. Desvios na heterostilia podem ocorrer a nível intraespecífico, entre flores de um único indivíduo, entre indivíduos de uma população e entre populações distintas (BAKER, 1966; GANDERS, 1979a; HAMILTON, 1990; FAIVRE; MCDADE, 2001).

A população estudada de *Rourea induta* apresentou distribuição agregada dos morfos. A segregação espacial dos morfos distílicos em uma população pode ser resultado do crescimento vegetativo, de diferenças na mortalidade, no estabelecimento e de diferenças no *fitness* reprodutivo desses *taxa* (LEVIN, 1974; ECKERT; BARRETT, 1992; ISHIHAMA *et al.*, 2003). No entanto, não foi observado crescimento vegetativo em *R. induta*. A distribuição agregada dos morfos, também indica uma grande distância entre as plantas com os diferentes morfos florais, implicando em uma maior distância que os polinizadores tem de percorrer para promover o fluxo regular de pólen entre os morfos.

Para que ocorra um fluxo ótimo de pólen compatível disponível para a reprodução é esperado que populações apresentassem uma proporção de ocorrência de 1:1 de seus morfos florais (KÉRY *et al.*, 2003; SHIBAYAMA; KADONO, 2003). A assimetria no fluxo de pólen em espécies distílicas também pode ocasionar especialização de gênero em algumas espécies distílicas (ROBLEDÓ, 2007). Mesmo com a anisopletia, razão desequilibrada na ocorrência dos morfos na população estudada de *Rourea induta*, foi observado em campo que essa espécie apresentava alta taxa de frutificação em ambos os morfos florais distílicos.

As análises de crescimento do tubo polínico não demonstraram resultados sólidos. Contudo, tubos polínicos provenientes de grãos de pólen das anteras não recíprocas

(nível maior) das flores longistilas chegando ao ovário de flores brevistilas evidenciam a compatibilidade intermorfo e a funcionalidade destes grãos na reprodução de *Rourea induta*. Um estudo realizado por Baker (1962) com outra espécie da família Connaraceae, *Byrsocarpus coccineus*, demonstrou que a população estudada apresentava autocompatibilidade parcial. É possível que os tubos polínicos possuam maior tempo para o início de seu crescimento ou a velocidade de crescimento dos mesmos pode ser lenta. Assim, um estudo mais detalhado desse sistema, com um número maior de réplicas e experimentos de polinizações manuais controladas e, a coleta de pistilos desses experimentos em um intervalo de tempo maior que 10 horas, poderiam apresentar resultados mais robustos a respeito do sistema de incompatibilidade em *R. induta*.

As flores brevistilas de *Rourea induta* apresentaram grãos de pólen com maiores diâmetros, característica, comumente, encontrada em espécies heterostílicas (JUNG-MENDAÇOLLI; MELHEM, 1995; TEIXEIRA; MACHADO, 2003). De acordo com Darwin (1896), esta diferença no tamanho dos grãos de pólen em flores distílicas é decorrente a um maior armazenamento de reservas nos grãos das flores brevistilas para o crescimento do tubo polínico nos longos estiletos das flores longistilas. Contudo, uma vez que as flores de *R. induta* apresentam estames com dois níveis de altura no mesmo morfo floral, seria interessante verificar se o tamanho dos grãos de pólen entre os dois níveis também apresentam diferenças em suas dimensões.

Além das características florais, o principal grupo de polinizadores (abelhas) de *Rourea induta* confirma a síndrome de melitofilia para a espécie. Uma vez que não houve diferença na frequência de visitas nos dois morfos florais, os visitantes podem contribuir com a polinização legítima intermorfo. Contudo, outras características na população estudada, como a presença de anisopleitia e a grande distância entre plantas de morfos diferentes, possam dificultar esse fluxo de pólen. A maior frequência dos visitantes de *R. induta* no período matutino pode ter ocorrido em resposta à disponibilidade dos recursos florais (néctar e pólen). De acordo com Lenza *et al.* (2008), a intensa atividade dos visitantes florais no período matutino pode diminuir a quantidade de recursos e, conseqüentemente, reduzir à atração de visitantes no período vespertino em *R. induta*.

## Agradecimentos

Agradecemos a Dra. Edivani Villaron Franceschinelli, Dr. Peter Kevan, Dr. Leonardo Galetto, Dra. Favízia Freitas de Oliveira, Dra. Blandina Viana, Dr. Breno Magalhães Freitas, Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira, Dr. Felipe Wanderley Amorim e demais professores do Curso Internacional de Polinização de 2012 pela oportunidade de aprendizado. Ao Dr. Hélder Nagai Consolaro pelas sugestões no manuscrito final e aos colegas (monitores e alunos), a nossa gratidão pelo companheirismo e as experiências proporcionadas.

## Referências

- BAKER, H. G. Heterostyly in the Connaraceae with Special Reference to *Byrsocarpus coccineus*. *Botanical Gazette*, n. 123, p. 206-211, 1962.
- BAKER, H. G. The evolution, functioning and breakdown of heteromorphic incompatibility systems. I. The Plumbaginaceae. *Evolution*, n. 20, p. 349-68, 1966.
- BARRETT, S. C. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*, n. 3, p. 274-284, 2002.
- BARRETT, S. C. H. The evolutionary biology of tristily. In: FUTUYMA, D.; ANTONOVICS, J. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, v. 9, Oxford: Oxford University Press. 1993. p. 283-326.
- BARRETT, S. C. H.; SHORE J. S. New insights on heterostyly: comparative biology, ecology and genetics. In: FRANKLIN-TONG, V. E. *Self-Incompatibility in Flowering Plants-Evolution, Diversity and Mechanisms*. Berlin: Springer-Verlag, p. 3-32, 2008.
- DAFNI, A; KEVAN, P. G.; HUSBAND, B. C. *Practical pollination biology*. Cambridge: Environquest Ltd, p. 590, 2005.
- DARWIN, C. R. *The different forms of flowers on plants of the same species*. New York: D. Appleton and Company, 1896.
- ECKERT, C. G.; BARRETT, S. C. H. Stochastic loss of style morphs from populations of tristylous *Lythrum salicaria* and *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Evolution*, n. 46, p. 1014-1029, 1992.
- FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. *The Principles of Pollination Ecology*. Oxford: Pergamon Press, p. 244, 1979.
- FELFILI, J. M. A Chapada dos Veadeiros. In: FELFILI, J. M.; REZENDE, A. V.; SILVA JÚNIOR, M. C. *Biogeografia do bioma Cerrado: vegetação e solos da Chapada dos Veadeiros*. Brasília: Editora Universidade de Brasília/Finatec, p.15-23. 2007.
- FRAIVE, A. E.; MCDADE, L. A. 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*, n. 88, p. 841-853, 2001.
- GANDERS, F. R. Heterostyly in *Erythroxylum coca* (Erythroxylaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, n. 78, p. 11-20, 1979a.
- GANDERS, F. R. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany*, n. 17, p. 607-635, 1979b.
- HAMILTON, C. W. Variations on a Distylous theme in mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden*, n. 55, p. 62-75, 1990.

ISHIHAMA, F.; NAKANO, C.; UENO, S.; AJIMA, M.; TSUMURA, Y.; WASHITANI, I., Seed set and gene flow patterns in an experimental population of an endangered heterostylous herb with controlled local opposite-morph density. *Functional Ecology*, n. 17, p. 680-689, 2003.

JUNG-MENDAÇOLLI, S.; MELHEM, T. Grãos de pólen de espécies heterostílicas de Rubiaceae. *Revista Brasileira de Botânica*, n. 18, p. 61-93, 1995.

KLINK, C. A.; MACEDO, R.; MUELLER, C. C. *De grão em grão, o Cerrado perde espaço*. Brasília: WWF e PRO-CER, 1995.

KLINK, C. A. Relação entre o desenvolvimento agrícola e a biodiversidade. Pp. 25-27. In: PEREIRA, R. C.; NASSER, L. C. B. Anais VIII Simpósio sobre o Cerrado, 1st International Symposium on Tropical Savanas - Biodiversidade e Produção Sustentável de Alimentos e fibras nos Cerrados. Brasília: Embrapa CPAC. 1996.

KÉRY, M.; MATTHIES, D.; SPILLMANN, H. H. Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primula veris* and *Gentiana lutea*. *Journal of Ecology*, n. 88, p. 17-30, 2000.

KÖPPEN, W. *Climatologia: Un estudo de los climas de La Tierra*. México. Fondo de Cultura Económica. 1948.

LENZA, E.; et al. Biologia reprodutiva de *Rourea induta* Planch. (Connaraceae), uma espécie heterostílica de cerrado do Brasil Central. *Revista Brasileira de Botânica*, n. 31, p. 389-398, 2008.

LEVIN, D. A. Spatial segregation of pins and thrums in populations of *Hedyotis nigricans*. *Evolution*, n. 28, p. 648-655, 1974.

LLOYD, D. G.; WEBB, C. J. The evolution of heterostyly. In: BARRETT S. C. H. (ed.). *Evolution and Function of Heterostyly*. Springer, Berlin, 1992. p. 151-178.

MARTIN, F. N. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology*, n. 34, p. 125-128, 1959.

MENDONÇA, R. C.; et al. Flora vascular do Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. Cerrado: ambiente e flora. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1998. p. 289-556.

MITTERMEYER, R. A.; MYERS, N.; MITTERMEIER, C. G. *Hotspots Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*. CEMEX Conservation International. 1999.

MITTERMEIER, R. A.; et al. Hotspots Revisited: earth's biologically richest and most endangered ecoregions. Conservation International, Mexico City. 2005.

MOMOSE, K.; et al. Pollination biology in a lowland dipterocarp forest in SARAWAK, M. I. Characteristics of the plantpollinator community in a lowland dipterocarp forest. *American Journal of Botany*, n. 85, p. 1477-1501, 1998.



- MYERS, N.; et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, n. 403, p. 853-858, 2000.
- RADFORD, A. E.; et al. Vascular plant systematics. New York: Harper & Row Publishers. 1974.
- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. *Cerrado: ecologia e flora*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. p. 151-212.
- GANDERS, F. R. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany*, n. 17, p. 607-635, 1979.
- GARCÍA-ROBLEDO, C. Asymmetry in pollen flow promotes gender specialization in morphs of the distylous neotropical herb *Arcytophyllum lavarum* (Rubiaceae). *Evolutionary Ecology*, n. 22, p. 743-755, 2008.
- SANCHEZ, J. M.; FERRERO, V.; NAVARRO, L. A new approach to the quantification of degree of reciprocity in distylous (sensu lato) plant populations. *Annals of botany*, n. 102, p. 463-72, 2008.
- SILVA, F. A. M.; ASSAD, E. D.; EVANGELISTA, B. A. Caracterização climática do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. *Cerrado: ecologia e flora*. Planaltina: Embrapa-CPAC, 2008. p. 71-88.
- SHIBAYAMA, Y.; KADONO, Y. Floral morph composition and pollen limitation in the seed set of *Nymphoides indica* populations. *Ecological Research*, n. 18, p. 725-737, 2003.
- TEIXEIRA, L. A. G.; MACHADO, I. C. *Sabicea cinerea* Aubl. (Rubiaceae): distyly and pollination in a fragment of Atlantic rain forest in Pernambuco, Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, n. 27, p. 193-204, 2004.
- WELLER, S. G. Evolutionary modifications of tristylous breeding systems. In: BARRETT, S. C. H. *Evolution and Function of Heterostyly*. New York, p. 247-270, 1992.

## Visitantes florais e morfologia das glândulas de óleo de *Pterandra pyroidea* A. Juss. (Malpighiaceae)

Thais Cury de Barros<sup>1</sup>  
Marina Muniz Moreira<sup>2</sup>  
Tiana Custodio<sup>3</sup>  
Letícia Biral de Faria<sup>4</sup>  
Edilene Melo de Jesus<sup>5</sup>

Recurso floral pode ser definido como qualquer componente da flor ou da inflorescência que é utilizado por animais e que devido a esse uso os animais realizam diversas visitas às flores que podem resultar em polinização. O pólen e o néctar são os principais recursos ofertados pelas plantas e desempenham importantes papéis na atração dos polinizadores a fim de promover a reprodução cruzada (FAEGRI; VAN DER PIJL, 1979; SIMPSON; NEFF, 1981). Além do pólen e do néctar, há diversos outros recursos florais, sendo um deles o óleo (SIMPSON; NEFF, 1981; WILLMER, 2011). O óleo floral é produzido por cerca de 1% das Angiospermas que se encontram distribuídas em 10 famílias botânicas, sendo uma delas a família Malpighiaceae (DAFNI *et al.*, 2005). A família Malpighiaceae é predominantemente tropical e ocupa diferentes habitats, sendo comumente encontrada em ambientes abertos como o cerrado brasileiro (ANDERSON, 1979). Nessa família o óleo floral é produzido em quatro a cinco pares de glândulas, elaióforos, localizados nos lobos do cálice da flor (ANDERSON, 1979).

As flores de Malpighiaceae do Neotrópico apresentam divergências quanto à morfologia dos frutos, pólen e hábito vegetal, porém tendem a uma similaridade com relação ao mecanismo de polinização - síndrome flor de óleo (ANDERSON, 1979; SAZIMA; SAZIMA, 1989; CARVALHO *et al.*, 2005).

As flores apresentam conjuntos de características (morfologia e recompensas – néctar, pólen, óleo, etc) que servem para atrair e utilizar um determinado grupo de animais como transportadores de pólen. Numa abordagem evolutiva os polinizadores exercem pressão

---

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo (thais\_cury@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro (marinammuniz@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (tianacustodio@gmail.com)

<sup>4</sup> Universidade de São Paulo (leticiafbfaria@yahoo.com.br)

<sup>5</sup> Universidade Federal da Bahia (edilenebee@yahoo.com.br)

seletiva sobre os traços florais o que pode levar a uma interação do tipo especialista entre planta e polinizador (BULLOCK, 1994; JOHNSON; STEINER, 2000; CULLEY *et al.*, 2002). Juntar ao parágrafo posterior. Os visitantes florais de Malpighiaceae são exclusivamente Hymenoptera. Espécies de abelhas sem ferrão (Meliponini) coletam pólen. Abelhas dos grupos Macropidini, Redivivini (Melittidae), Ctenoplectrini, Centridini, Tapinostapidini e Tetrapediini (Apidae), sendo as últimas três tribos especialmente diversas na região neotropical, coletam o óleo e/ou pólen (ANDERSON, 1979; ALVES-DOS-SANTOS *et al.*, 2007).

*Pterandra pyroidea* A. Juss. (Malpighiaceae) é uma planta perene de porte herbáceo, com 1 a 2 m de altura, com inflorescências compostas por flores rosadas que possuem quatro ou cinco elaióforos brancos ou rosados nos lobos do cálice. As cinco pétalas das flores são unguiculadas, sendo uma delas considerada estandarte, o que as confere uma simetria zigomorfa. A flor não apresenta disco de néctar, sendo os recursos disponíveis óleo e pólen. Há estames livres com anteras de abertura longitudinal. A parte feminina é composta por três carpelos (ANDERSON, 1997; CAPPELLARI *et al.*, 2011).

Os objetivos deste trabalho foram: (i) verificar se o óleo floral é o principal recurso disponível para visitantes de *P. pyroidea* e (ii) analisar a morfologia das glândulas de óleo (elaióforos).

## Material e Métodos

### *Área de estudo*

O estudo foi realizado em setembro de 2012 no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros (PNCV) e área de entorno, localizado a nordeste do estado de Goiás, Brasil (14° 10' 0" S, 47° 30' 0" W). A área é parte do Bioma Cerrado, segundo maior bioma brasileiro, que possui relações ecológicas e fisionômicas com savanas do continente Americano, Africano e Australiano. Apresenta clima tropical sazonal caracterizado por duas estações bem definidas: uma seca (Maio-Setembro) e outra chuvosa (Outubro-Abril) (PRUDENTE, 2010). O estudo em *P. pyroidea* foi realizado no final da estação seca.

### *Visitantes florais*

Os visitantes florais foram analisados através de observações focais diretas (ALTMAN, 1974) das 6h às 18h (12 horas totais) e indiretas. As observações diretas foram realizadas em quatro indivíduos de *P. pyroidea* com glândula de óleo. Os visitantes florais foram coletados e identificados por especialista, sendo o material testemunho depositado no Museu de Zoologia da Universidade Federal da Bahia. Para cada visitante floral foi registrado o comportamento, tipo de recurso obtido e frequência de visita. As observações indiretas de visitantes coletores de óleo ocorreram através da análise de presença/ausência de

elaióforos raspados (raspados = ocorreu visita; não raspados = não ocorreu visita) para isso foram utilizadas cinco flores de dez indivíduos diferentes (n=50 flores e 500 elaióforos).

### *Quantificação e gradiente de pólen*

Grãos de pólen foram obtidos de cinco indivíduos, quatro flores e um botão (controle), a partir de flores recém-abertas. As anteras foram coletadas em diferentes horários ao longo do dia a cada duas horas (10h, 12h, 14h e 16h). A quantificação e a análise do gradiente de pólen foram realizadas através da suspensão de anteras individuais em uma solução líquida e o número de grãos de pólen conhecido por alíquota líquida contada de conforme Dafni *et al.*, (2005).

### *Glândulas de óleo: Morfologia*

Flores recém-abertas foram coletadas e mergulhadas em solução de Vermelho Neutro por 10 minutos para verificar a presença de tecidos metabolicamente ativos (localização das glândulas de óleo) (VOGEL, 1990) e possíveis regiões danificadas na glândula.

Para o estudo da morfologia glandular, glândulas provenientes de botões em diferentes estádios, flores em pré-antese e em antese, assim como frutos no início do desenvolvimento foram coletados de 10 indivíduos e imediatamente submetidos à fixação em solução de FNT (Formalina Neutra Tamponada) (CLARK, 1981) por 48 horas, lavados em água destilada, submetidos ao processo de desidratação e conservadas em álcool 70%. Posteriormente, os materiais foram dissecados com o auxílio de lupa estereoscópica e preparados para os exames de superfície (Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV). Para isso, os materiais previamente fixados foram desidratados em série etanólica (TUCKER, 1993), submetidos ao ponto crítico em um aparelho Bal Tec CPD 030, montados em suportes metálicos sobre fita adesiva de Carbono e cobertos com Ouro em um metalizador BalTec SCD 050 por 160 segundos. As observações e imagens foram realizadas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, em um microscópio eletrônico de varredura Zeiss IVO-50 em 15kv, e as fotomicrografias obtidas em uma câmera digital acoplada (microscopia de luz).

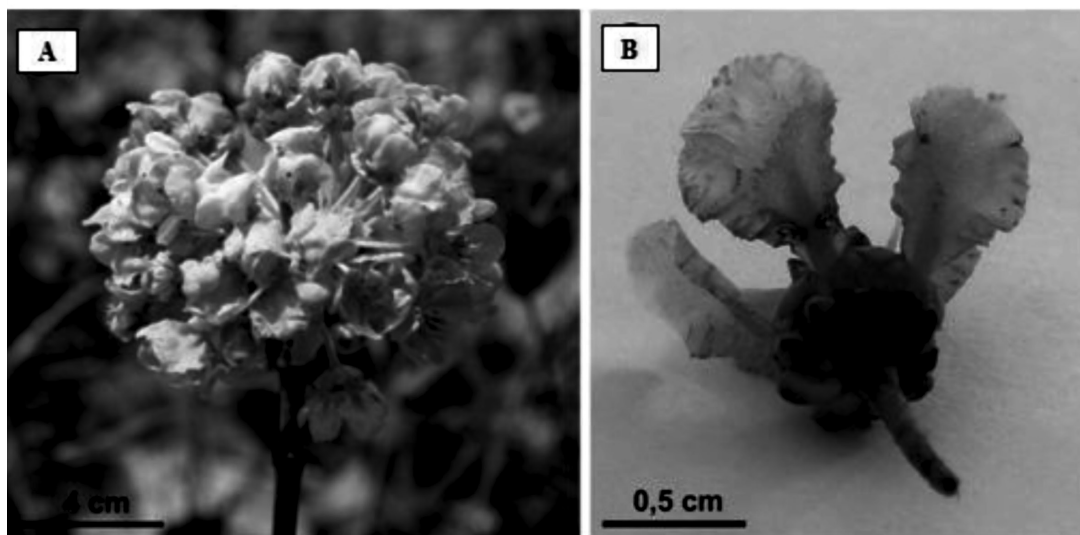
Para o estudo anatômico, as glândulas de botões em vários estádios foram submetidas à desidratação em série etanólica, incluídas em resina histológica (GERRITS, 1991) e seccionadas transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo (4  $\mu$ m de espessura). As seções seriadas foram coradas com Azul de Toluidina 0,05% em tampão fosfato (pH = 4,4) (O'BRIEN *et al.*, 1964), montadas em resina sintética e observadas em microscópio de luz. Para a verificação da natureza do exsudato produzido pelas glândulas, os cortes seriados foram submetidos também ao reagente Sudan Black B (JOHANSEN, 1940), que indica a presença de lipídeos. As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio Leica DM 4500 B acoplado a uma câmera digital Leica DFC 320 e as escalas nas mesmas condições ópticas.

## Resultados

*Pterandra pyroidea* é uma planta de porte herbáceo (fig. 1A) com flores rosadas que possuem de quatro a cinco pares de elaióforos nos lobos do cálice. Seu período de abertura floral inicia-se entre 7h e 7h30 da manhã. Logo após a abertura floral suas pétalas apresentam coloração rosada e estão completamente distendidas, com exceção da pétala estandarte que permanece um pouco mais fechada que as demais. Desde o momento de sua abertura a região estigmática já se encontra receptiva, o que foi evidenciado através da reação positiva ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), sendo os grãos de pólen liberados posteriormente, a partir das 10h da manhã.

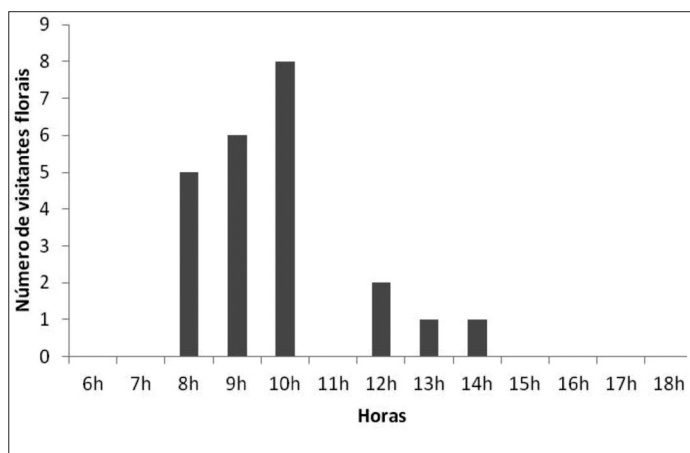
As flores possuem duração de um dia, sendo possível observar uma mudança no posicionamento das pétalas e de coloração ao longo da vida floral. Quando senescente apresenta uma coloração alvo rosada e ocorre o fechamento das pétalas, iniciada pela pétala estandarte. Em algumas flores notou-se a presença de glândulas danificadas, confirmadas pela observação focal e pela reação positiva ao Vermelho Neutro (Fig. 1B).

**Figura 1** - A. Inflorescência de *Pyterandra pyroidea* (Malpighiaceae). B. Elaióforos com danos evidenciados pelo Vermelho Neutro



### *Visitantes florais*

Durante as 12 horas contínuas de observação em campo, visualizamos 23 abelhas visitando as flores de *P. pyroidea*, sendo que o maior número de indivíduos em um intervalo de uma hora foi observado às 10h (n=8) (Fig. 2).



**Figura 2** - Número de abelhas visitando flores de *Pterandra pyroidea* (Malpighiaceae) ao longo de 12 horas contínuas de observação, Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brasil

Esses indivíduos são de seis espécies pertencentes a seis gêneros (Tab. 1). Pelo comportamento dos indivíduos na flor, podemos observar que nenhum deles entrou em contato com as glândulas de óleo, encostando apenas nas partes reprodutivas – anteras e estigmas – das flores e coletaram pólen. A análise indireta de visitantes coletores de óleo revelou que do total de 50 flores 12% apresentaram elaióforos raspados, indicando uma possível visita. No que tange ao total de elaióforos analisados (n=500), 4.8% estavam raspados.

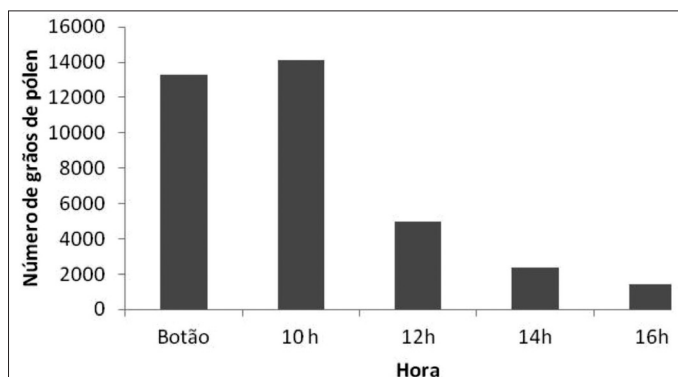
**Tabela 1** - Visitantes florais de *Pterandra pyroidea* (Malpighiaceae) ao longo de 12 horas contínuas de observação focal, Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brasil

Subfamília	Tribo	Espécie	Nº de indivíduos
Apinae	Euglossini	<i>Euglossa</i> sp.	1
Apinae	Exomalopsini	<i>Exomalopsis</i> sp.	1
Apinae	Meliponini	<i>Plebeia</i> sp.	17
Apinae	Meliponini	<i>Frieseomelitta varia</i> (Lepelletier, 1836)	2
Apinae	Xylocopini	<i>Xylocopa</i> sp.	1
Halictinae	Augochlorini	<i>Augochloropsis</i> sp.	1

### Quantificação e gradiente de pólen

Foram encontrados 13.312 grãos de pólen no botão floral de *P. pyroidea*. Entretanto devido à baixa amostragem não é possível quantificar de forma precisa o número de grãos de pólen produzidos por flores de *P. pyroidea* (Fig. 3). A análise do gradiente do pólen demonstrou uma redução dos grãos de pólen ao longo do dia, o que pode estar relacionado à coleta de pólen pelos visitantes florais (Fig. 3).

**Figura 3** - Número de grão de pólen presente em flores de *Pterandra pyroidea* (Malpighiaceae) ao longo do dia em diferentes horários (10h, 12h, 14h e 16h). O botão floral foi usado como controle



### *Glândulas de óleo: Morfologia*

O estudo da morfologia da glândula foi realizado em unidades reprodutivas em diferentes estádios: botão, flor aberta e fruto (Fig. 4A, estágio III, IV, VII, respectivamente). A análise de superfície (MEV) mostrou que as glândulas caracterizam-se como estruturas elípticas cobertas por uma cutícula espessa e sem poros. O óleo produzido é acumulado entre a epiderme e a cutícula. O formato da glândula não se altera durante o desenvolvimento da flor, porém no botão (Fig. 4B) e na flora aberta (Fig. 4C) a cutícula apresenta-se visivelmente mais distendida do que no fruto (Fig. 4D). Abaixo da cutícula (Fig. 4E) as glândulas apresentam numerosas papilas (Fig.4F).

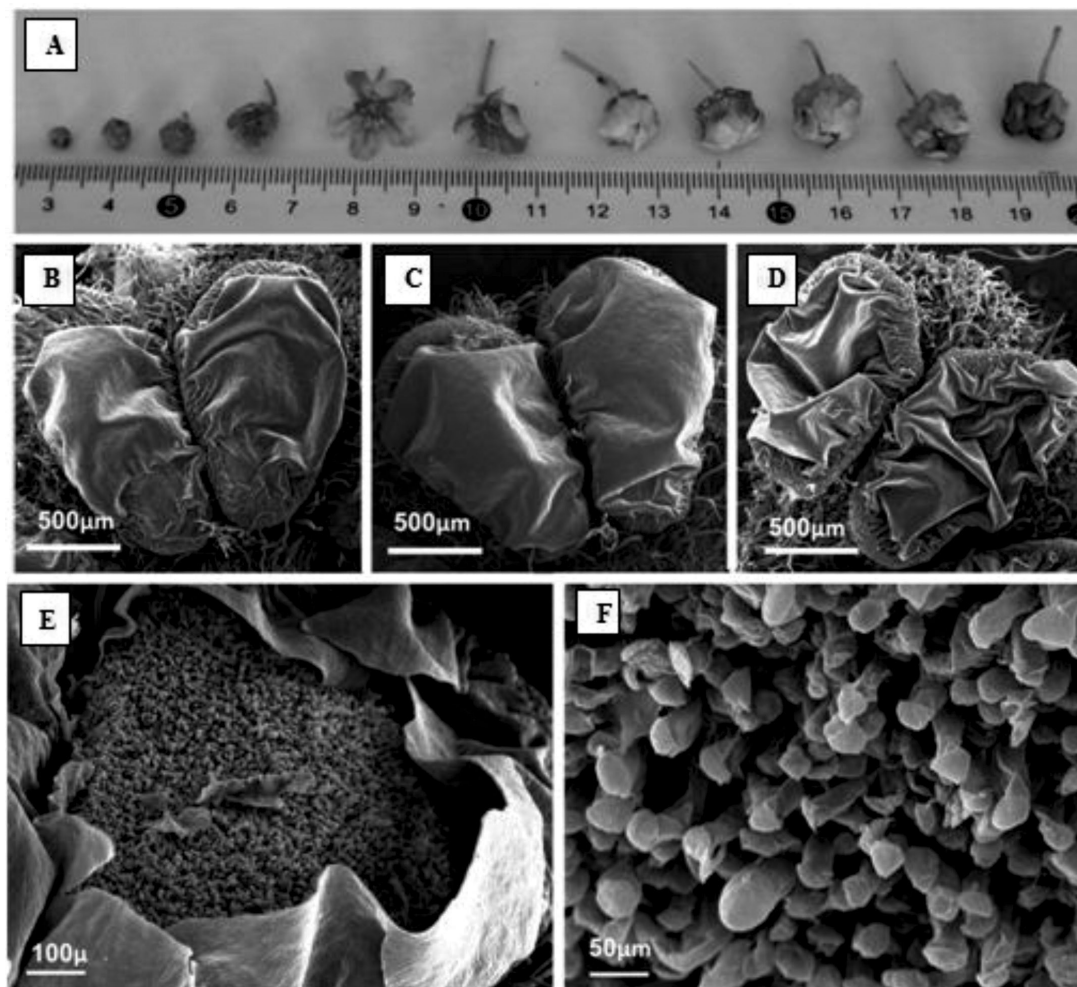
Em botões imaturos (Fig. 5A) a cutícula ainda não está distendida, indicando a ausência da produção de óleo em estádios muito iniciais de desenvolvimento. Também unir ao parágrafo seguinte. Sempre evite parágrafos tão curtos assim, especialmente quando o parágrafo seguinte discute exatamente o mesmo contexto do anterior.

Em secções longitudinais é possível observar como as glândulas estão organizadas. São estruturas vascularizadas, compostas por uma matriz de células parenquimáticas e uma epiderme papilosa coberta por uma cutícula espessa que se distende ao longo do desenvolvimento da flor e que acumula o óleo produzido pela glândula (Fig. 5B).

Nas papilas e em uma única camada abaixo da epiderme foram encontrados conteúdos fenólicos (Fig. 5C e Fig. 5D). O teste com o Sudan Black B revelou a presença de pequenas gotas de óleo apenas no interior das papilas (Fig. 5E), caracterizando-as como sítio de produção de óleo em *P. pyroidea*. Após ser produzido nas papilas, o óleo é liberado e acumulado abaixo da cutícula (Fig. 5F), onde permanece até a ruptura mecânica da cutícula pelo visitante.

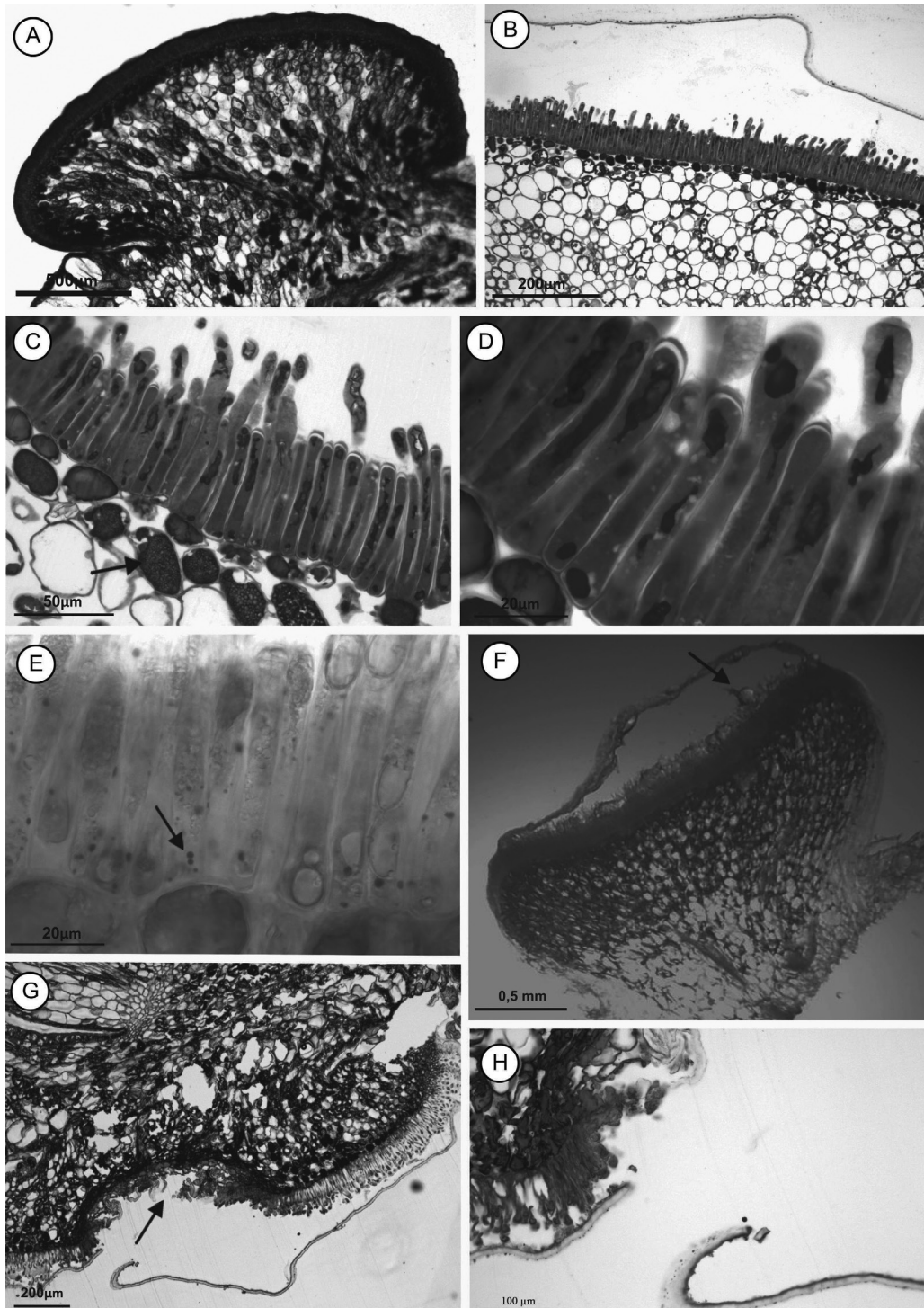
Em glândulas visitadas é possível ver a ruptura da cutícula, bem como o dano causado na epiderme e nas primeiras camadas de células subepidérmicas parenquimáticas (Fig. 5G). Outra característica interessante é o aumento do número de células fenólicas nos tecidos danificados (Fig. 5H), que provavelmente estão relacionadas ao processo de cicatrização do tecido vegetal e combate as possíveis ações de patógenos.

**Figura 4** - A. Flores em diferentes estádios. B–F. Imagens obtidas por MEV. D - F. Glândulas de óleo do botão, flor aberta e fruto, respectivamente. G. Detalhe da cutícula rompida manualmente em uma glândula da flor aberta. H. Detalhe das células papilhosas (secretoras) da glândula de óleo





**Figura 5** - Microscopia de luz. A. Glândula de óleo do botão. B – H Glândula de óleo na flor aberta. C–D. Detalhe das papilas secretoras e células taniníferas (seta). E. Detalhe das papilas mostrando a produção de óleo em gotículas (seta). F. Acúmulo de óleo entre a cutícula e epiderme papilosa (seta). G. Área danificada na glândula pela ação dos visitantes (seta). H. Detalhe da cutícula rompida.



## Discussão

Este trabalho teve como objetivo avaliar se o óleo é o principal recurso oferecido por flores glandulares de *P. pyroidea* do Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros (PNCV), bem como elucidar a ultraestrutura e anatomia dessas glândulas.

Neste estudo observamos de forma direta uma baixa frequência de visitantes florais realizando coleta de óleo e também uma baixa taxa desses inferidas de forma indireta pela observação de presença/ausência de elaióforos danificados. Esses resultados indicam que o óleo não é o principal recurso buscado pelos visitantes de *P. pyroidea*, mas sim grãos de pólen, que segundo nossos dados apresentam uma diminuição ao longo do dia. Essas mesmas constatações foram feitas por Cappelari *et al.*, (2011), em um estudo realizado na Reserva Ecológica do IBGE no sudeste de Brasília, Brasil, onde populações de *P. pyroidea* apresentam flores com e sem glândulas. Os autores desse estudo relatam que em ambos os morfotipos o pólen é o principal recurso obtido pelos visitantes florais. Ambos os estudos sugerem a ocorrência de uma mudança no sistema de polinização de flores de óleo para flores de pólen em indivíduos de *P. pyroidea*.

A transição de um sistema de polinização generalista para um especialista é comum e já ocorreu diversas vezes durante a história evolutiva de muitas espécies de Angiospermas (CULLEY *et al.*, 2002; THOMSON; WILSON, 2008). Apesar do processo inverso (especialista-generalista) ser mais raro, parece ser o que ocorre em *P. pyroidea*. A passagem de óleo a pólen tem acarretado em perda dos elaióforos em diversas populações de plantas da família Malpighiaceae. Essa perda pode ser vista em indivíduos que se dispersaram e que ocupam atualmente áreas onde não há ocorrência de abelhas coletoras de óleo, como Madagascar (ANDERSON, 2001; DAVIS, 2002; CAPPELARI *et al.*, 2011). Porém essa afirmativa não explica nossas observações já que, segundo Raw *et al.*, (1998; 2002), o Cerrado é um centro de diversidade e riqueza de abelhas coletoras de óleo. Duas possíveis explicações seriam então a disputa pelas abelhas por diferentes espécie de Malpighiaceae devido às diferenças na quantidade e qualidade do óleo produzido (HALEEM *et al.*, 2010; CAPPELARI *et al.*, 2011), e/ou a baixa procura de óleo pelas abelhas que parecem ser menos dependentes desse recurso em locais xéricos, já que a umidade não é um risco ao seu desenvolvimento (SIMPSON; NEFF, 1981).

As mudanças nos sistemas de polinização podem ser influenciadas pela falta ou a diminuição do número de visitantes florais e/ou também a ausência ou redução dos recursos florais ofertados a esses polinizadores em determinadas áreas ou ecossistemas (BRADSHAW; SCHEMSKE, 2003; CROK; OJEDA, 2008). Nossas observações corroboram a ideia de que plantas e polinizadores estabelecem relações especialistas que são fortemente moduladas por fatores ambientais, ou seja, mudanças nas condições do hábitat podem reforçar ou desfazer essas ligações, através do favorecimento ou não dessas interações.

## Ultraestrutura e anatomia do elaióforo

As glândulas de *P. pyroidea* apresentam-se como estruturas de forma elíptica, papilosas, desprovidas de poros, recobertas por uma espessa cutícula que armazena o óleo produzido. Segundo os resultados obtidos, as papilas seriam os principais locais de produção do óleo. Um estudo realizado por Castro *et al.*, (2011), sobre a ultraestrutura de glândulas florais de *Galphinia brasiliensis* (Malpighiaceae), revelou glândulas com formato de taça revestidas por uma cutícula delgada.

As secções longitudinais realizadas da glândula mostraram uma organização similar à encontrada em outras espécies de Malpighiaceae: cutícula, epiderme (tecido secretor) e uma matriz de células parenquimáticas (CASTRO *et al.*, 2001; ATTALA; MACHADO, 2003).

Durante o desenvolvimento da flor (de botão a fruto) o volume de óleo apresenta variação. A maior quantidade de óleo parece se encontrar no botão e na flor aberta, estágios onde foi possível visualizar uma distensão da cutícula. Já em botões muito jovens e no fruto a cutícula não se encontrava distendida, evidenciando a ausência de óleo. Essa flutuação nas quantidades de óleo pode estar relacionada à fase de reprodução das flores (síndrome de flor de óleo), onde o maior volume de óleo fica disponível para uso como recurso pelos possíveis polinizadores.

## Considerações Finais

Com este estudo pudemos constatar que o óleo não é o principal recurso procurado pelos visitantes de *P. pyroidea*, mas sim o pólen. No que se refere à morfologia da glândula podemos afirmar que há uma variação no volume de óleo produzido durante as fases de desenvolvimento da flor.

Estudos mais longos mostram-se necessários para o completo entendimento dos fatores que atuam no processo evolutivo de transição de recursos que está ocorrendo nas populações de *P. pyroidea*.

## Referências

ALTMANN, S. A. Observational study of behavior: sampling methods. *Behavior*, n. 49. p. 227-265, 1974.

ALVES-DOS-SANTOS. I.; MACHADO, I. C.; GAGLIANONE, M. C. História natural das abelhas coletoras de óleo. *Oecologia Brasiliensis*, n. 11, v. 4, p. 544-557, 2007.

ANDERSON, W. R. Floral conservatism in neotropical Malpighiaceae. *Biotropica*, n. 11, p. 219-223, 1979.

- ANDERSON, C. Revision of *Pterandra*. Contributions of the University of Michigan Herbarium, n. 21, p. 1-27, 1997.
- ANDERSON, W. R. Observations on the Malagasy genus *Rhynchophora* (Malpighiaceae). Contributions of the University of Michigan Herbarium, n. 23, p. 53–58, 2001.
- ATTALA, N. C.; MACHADO, S. R. Anatomy and ultrastructure of *Banisteriopsis variabilis* Gates (Malpighiaceae) calyx glands. In: PROCEEDINGS OF THE XIX CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR MICROSCOPY AND MICROANALYSIS, 2003. Anals of the Proceedings of the XIX Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis, 2003.
- BRANDSHAW, H. D.; SCHEMSKE, D. W. Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers (*Mimulus*). *Nature*, n. 426, p. 176-178, 2003.
- BULLOCK, S. H. Wind pollination of neotropical deciduous trees. *Biotropica*, n. 26, p. 172-179, 1994.
- CAPPELARI, S. C.; et al. *Pterandra pyroidea*: a case of pollination shift within Neotropical Malpighiaceae. *Annals of Botany*, n. 107, p. 1323-1334, 2011.
- CARVALHO, P. D.; BORBA, E. L.; LUCCHESI, A. M. Variação no número de glândulas e produção de óleo em flores de *Stigmaphyllon paralias* A. Juss. (Malpighiaceae). *Acta Botanica Brasileira*, n. 19, p. 209-214, 2005.
- CASTRO, M. A.; VEGA, A. S.; MULGURA, M. EStructure and ultrastructure of leaf and calyx glands in *Galpimia brasiliensis* (Malpighiaceae). *American Journal of Botany*, n. 88, v. 11, p. 1935-1944, 2001.
- CRONK, Q.; OJEDA, I. Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. *Journal of Experimental Botany*, n. 59, p. 715-727, 2008.
- CULLEY, T. M.; STEPHEN, W. S. G.; SAKAI, A. K. The evolution of wind pollination in Angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution*, n. 17, p. 361-369, 2002.
- DAFNI, A. *Pollination ecology: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 1992.
- DAFNI, A.; PACINI, E.; NEPI, M. Pollen and stigma biology. In: DAFNI, A.; KEVAN, P. G.; HUSBAND, B. C. *Practical pollination biology*. Ontario: Environquest, 2005. p. 83-142.
- DAVIS, C. C. *Madagasikaria* (Malpighiaceae): a new genus from Madagascar with implications for floral evolution in Malpighiaceae. *American Journal of Botany*, n. 89, p. 699-706, 2002.
- FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. *The Principles of Pollination Ecology*. Oxford: Pergamon Press, 1979. 244p.

- GERRITS, P. O. The application of glycol methacrylate in histotechnology: some fundamental principles. Department of Anatomy and Embryology, State University Groningen, p. 80, 1991.
- HALEEM, M. A. *et al.* Isolation and chemical characterization of new Malpighiaceae floral fatty acids. In: PROCEEDINGS OF THE 11TH INTERNATIONAL CHEMISTRY CONFERENCE AND EXHIBITION IN AFRICA: THE ROLE OF CHEMISTRY IN THE DEVELOPMENT OF AFRICA, 2010, Luxor. Anais of the proceedings of the 11th International chemistry conference and exhibition in Africa: the role of chemistry in the development of Africa, Egito. 2010.
- JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1940.
- JOHSON, S. D.; STEINER, K. E. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends Ecology and Evolution*, n. 15, p. 140-143, 2000.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCCULL, Y M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma*, n. 59, p. 368-373, 1964.
- PRUDENTE, T. D. *Geotecnologia aplicada ao mapeamento de risco de incêndio florestal no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros e área de entorno*. 2010, 116p. Dissertação (Mestrado em Geografia). Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2010.
- RAW, A; BOAVENTURA, M. C; FREITAS, G. S. *As abelhas silvestres do Distrito Federal*. Brasília: Universidade de Brasília, 1998. Relatório de produção científica online.
- RAW, A; BOAVENTURA, M. C; FREITAS, G. S. The diversity of a bee fauna: the species of the cerrados of Central Brazil. In: KEVAN, P; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. *Pollinating bees – the conservation link between agriculture and nature*. Brasília: Brazilian Ministry of Environment, 2002.
- SAZIMA M.; SAZIMA. I. Oil-gathering bees visit flowers of eglandular morphs of the oil-producing Malpighiaceae. *Botanica Acta*, n. 102, p. 106-111, 1989.
- SIMPSON, B. B.; NEFF, J. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 68, 301-322, 1981.
- THOMSON, J. D; WILSON, P. Explaining evolutionary shifts between bee and hummingbird pollination: convergence, divergence, and directionality. *International Journal of Plant Sciences*, n. 169, p. 23–38, 2008.
- TUCKER, S. C. Floral ontogeny in Sophoreae (Leguminosae, Papilionoideae). I *Myroxylon* (Myroxylon group) and *Castanospermum* (Angylocalyx group). *American Journal of Botany*, n. 80, p. 65-75, 1993.
- VOGEL, S. *The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores*. Washington: Smithsonian Institution Libraries. 1990.
- WILLMER, P. *Pollination and floral ecology*. New Jersey: Princeton University Press, 2011.

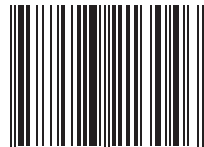


## Colofão

Formato	200 x 270 mm
Tipografia	Swiss 721 BT
Papel	Alta Alvura 75 g/m <sup>2</sup> (miolo) Cartão Supremo 300 g/m <sup>2</sup> (capa)
Impressão e acabamento	Cian Gráfica
Tiragem	500 exemplares



ISBN 978-85-232-1304-6



9 788523 213046



PUCRS



Ministério do Meio Ambiente

