

**CELICE ALEXANDRE SILVA**

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE TRÊS ESPÉCIES DISTÍLICAS DE *Psychotria*  
L. E EFEITOS DA FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL NO SUCESSO  
REPRODUTIVO E NA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Psychotria hastisepala*  
Müll. Arg. (RUBIACEAE)**

**Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Botânica, para obtenção do título  
de *Doctor Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007**

**CELICE ALEXANDRE SILVA**

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE TRÊS ESPÉCIES DISTÍLICAS DE *Psychotria*  
L. E EFEITOS DA FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL NO SUCESSO  
REPRODUTIVO E NA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Psychotria hastisepala*  
Müll. Arg. (RUBIACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 13 de Abril de 2007.

---

Prof. Luiz Orlando de Oliveira  
(Co-Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Rita Maria de Carvalho-Okano  
(Co-Orientadora)

---

Prof. Lucio Antônio de Oliveira Campos

---

Prof. Wagner Campos Otoni

---

Prof<sup>a</sup>. Milene Faria Vieira  
(Orientadora)

Ao meu marido Raimundo

Às minhas filhas Marinna e Beatriz

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a Santa Rita de Cássia, pelo fortalecimento da minha fé a cada dificuldade imposta pela vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela formação profissional e pela oportunidade de realização do curso.

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

À Professora Milene Faria Vieira, pela orientação, pelo exemplo de profissionalismo e competência, pelo carinho e pela amizade e por todas as risadas que demos e daremos juntas.

Ao Professor Luiz Orlando de Oliveira, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos, pela confiança e pelas importantes sugestões.

À Professora Rita Maria de Carvalho-Okano, pelas valiosas sugestões, pelo apoio e pela amizade.

Ao Professor Lucio Antônio de Oliveira Campos, pela identificação das abelhas e importantes sugestões.

Ao Professor Paulo Eugenio de Oliveira, pelas preciosas sugestões.

Ao Professor Wagner Campos Otoni, pela participação e sugestões.

Ao Professor Fernando A. Silveira, pela identificação das abelhas.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação profissional.

À Cibele Hummel do Amaral, minha fiel companheira de campo, pelo apoio incondicional, por todos momentos difíceis e felizes que passamos juntas.

À Ana Aparecida Bandini Rossi, pela amizade, pelo apoio e pela valiosa ajuda no Laboratório de Seqüenciamento de DNA.

À Maurecilne Lemes da Silva, pela amizade e confiança.

Ao Luiz Alberto Pessoni, pela amizade e pelas valiosas sugestões.

Ao Reinaldo Antonio Pinto, pela confecção das pranchas.

Aos amigos do laboratório de Seqüenciamento de DNA, Bruna, Giselle, Márcia, Maíra, Bia, Polyana, Mariana, Fernanda, Cassiana, pelo convívio, pelo apoio e pela preciosa ajuda.

Aos amigos da Botânica, Luzia, Mariana, José, Sileimar, Grazi, Andresa, Èrica, Kacilda pelo convívio e pelo apoio.

Ao Ângelo e Ilza, funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, pela ajuda prestada no decorrer do curso.

Aos motoristas da UFV, pela paciência e pela atenção durante as viagens ao campo.

À amiga Andrea, por estar sempre presente nos momentos mais difíceis da minha vida.

À minha família, por ser meu “porto-seguro” e dar sentido à minha vida.

À Cristina, pela confiança e pelo carinho dedicado a minha família.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Celice Alexandre Silva, nasceu em Bom Jesus do Amparo, Minas Gerais, filha de Manoela da Luz Silva e Raimundo Alexandre.

Em agosto de 1999, obteve o grau de Engenheiro Florestal, pela Universidade Federal de Viçosa. Em março de 2001, iniciou o curso de mestrado em Botânica, pela Universidade Federal de Viçosa. Em março de 2003, iniciou o curso de doutorado em Botânica pela Universidade Federal de Viçosa. Em setembro de 2007 tornou-se professora da Universidade do Estado do Mato Grosso (UNEMAT).

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT.....	x
Introdução geral .....	01
<b>Capítulo 1. Fenologia reprodutiva e polinizadores de três espécies distílicas de <i>Psychotria</i> (Rubiaceae) em fragmento florestal do sudeste brasileiro</b>	<b>07</b>
Resumo .....	08
Introdução .....	09
Material e métodos .....	10
Área de estudo e espécies estudadas .....	10
Fenologia reprodutiva .....	11
Visitantes florais .....	13
Resultados .....	13
Fenologia reprodutiva .....	13
Visitantes florais .....	17
Discussão .....	21
Conclusões .....	24
Referências .....	25
<b>Capítulo 2. Sucesso reprodutivo de três espécies distílicas de <i>Psychotria</i> (Rubiaceae) em fragmento florestal do sudeste brasileiro</b>	<b>28</b>
Resumo .....	29
Introdução .....	30
Material e métodos .....	31
Área de estudo e espécies estudadas .....	31
Proporção entre os morfos florais .....	32

Polinizações manuais <i>In vivo</i> .....	32
Tamanho e viabilidade dos grãos de pólen .....	32
Produção de frutos e sementes .....	33
Resultados .....	33
Proporção de morfos .....	33
Sistema reprodutivo .....	33
Viabilidade e tamanho dos grãos de pólen .....	34
Produção de frutos e sementes .....	34
Discussão .....	36
Conclusões .....	38
Bibliografia .....	40
Capítulo 3. <b>Efeito da fragmentação florestal no sucesso reprodutivo e na diversidade genética de <i>Psychotria hastisepala</i> Müll. Arg. (Rubiaceae)</b> .....	43
Resumo .....	44
Introdução .....	45
Material e métodos .....	47
Área de estudo .....	47
Espécie estudada .....	49
Extração de DNA .....	49
Seleção de primers e otimização do PCR .....	50
PCR - Amplificação de ISSR .....	51
Análise de dados moleculares .....	51
Resultados .....	52
Sucesso reprodutivo .....	52
Polimorfismo de ISSR e diversidade genética dentro de fragmentos ..	54
Discussão .....	58
Conclusões .....	60
Bibliografia .....	61

## RESUMO

SILVA, Celice Alexandre, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2007. **Biologia reprodutiva de três espécies distílicas de *Psychotria* L. e efeitos da fragmentação florestal no sucesso reprodutivo e na diversidade genética de *P. hastisepala* Müll. Arg. (Rubiaceae).** Orientadora: Milene Faria Vieira. Co-Orientadores: Luiz Orlando de Oliveira e Rita Maria de Carvalho-Okano.

Foram objetivos analisar aspectos da biologia reprodutiva, incluindo o sucesso reprodutivo, de três espécies distílicas de *Psychotria*, *P. conjugens*, *P. hastisepala* e *P. sessilis*, em 2004/2005 e 2005/2006, no maior fragmento florestal do município de Viçosa, e verificar como a fragmentação florestal vem afetando o sucesso reprodutivo e a estrutura genética de *P. hastisepala*, usando marcadores ISSR, em sete fragmentos florestais, com diferentes dimensões. A floração das espécies foi seqüencial, na estação chuvosa, iniciada por *P. sessilis*, seguida por *P. conjugens* e, por último, *P. hastisepala*. Houve sincronia de floração entre os morfos florais. As espécies foram polinizadas por abelhas em comum, incluindo espécies de *Melipona*, e, principalmente, *Ariphanarthra palpalis*. Os morfos de cada espécie foram visitados pelas mesmas abelhas, mas houve tendência de um dos morfos ser mais visitado que o outro, especialmente o longistilo, e variações anuais na composição e na abundância de espécies de polinizadores. A

atratividade às flores pareceu ser dependente dos números de inflorescências produzidas e de flores abertas/indivíduo/dia. A frutificação das espécies foi sincronizada. Em uma área de sete hectares, as espécies estão em isoplelia e as polinizações manuais *in vivo* demonstraram incompatibilidade intramorfos. A viabilidade dos grãos de pólen foi alta (>64%), em ambos os morfos das três espécies. O diâmetro dos grãos de pólen das flores brevistilas foi significativamente maior, em todas as espécies. A frutificação natural foi alta ( $\geq 53\%$ ) em ambos os morfos de *P. sessilis* e no morfo brevistilo de *P. hastisepala*. Em *P. conjugens* e no morfo longistilo de *P. hastisepala* a frutificação natural foi baixa ( $\leq 29\%$ ). Não houve diferença significativa no número de frutos e sementes entre os morfos em *P. sessilis* e *P. conjugens*. As flores brevistilas de *P. hastisepala* produziram um número de frutos e de sementes significativamente maior que as longistilas. *P. conjugens* apresentou uma das menores quantidades totais de sementes e seu baixo sucesso reprodutivo parece estar relacionado à limitação de pólen. Em *P. hastisepala*, a oclusão do estigma, com pólen incompatível, e os danos causados por herbívoros ao estigma podem ser fatores relacionados ao baixo sucesso reprodutivo do morfo longistilo. Na análise da estrutura genética de *P. hastisepala*, os índices de Shannon (I) e Nei ( $H_E$ ) e a AMOVA revelaram grande variação genética dentro e entre fragmentos florestais. Não foram obtidas correlações significativas entre a matriz de distância geográfica e distância genética. Em todos os fragmentos, o sucesso reprodutivo foi maior no morfo brevistilo, não apresentando uma clara correlação com o tamanho do fragmento. Os resultados mostraram que o sucesso reprodutivo pode ser afetado pela qualidade da matriz, disponibilidade de polinizadores, número de indivíduos e perda do hábitat de *P. hastisepala*.

## ABSTRACT

SILVA, Celice Alexandre, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2007.  
**Reproductive biology of three distylous species of *Psychotria* and effects of forest fragmentation in the reproductive success and the genetic structure on *P. hastisepala* Müll. Arg. (Rubiaceae).** Adviser: Milene Faria Vieira. Co-Advisers: Luiz Orlando de Oliveira and Rita Maria de Carvalho-Okano.

The aims were to analyze the aspects of reproductive biology, including the reproductive success, of three *Psychotria* distylous species, *P. conjugens*, *P. hastisepala* and *P. sessilis*, in 2004/2005 and 2005/2006, in the largest forest fragment in the municipality of Viçosa (20°45'S and 42° 54'W), in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. Besides that, it was to verify how the forest fragmentation has been affecting the reproductive success and the genetics structure of *P. hastisepala*, using ISSR markers, in seven forest fragments, with different dimensions. The flowering of the species was in sequence, in the rainy season, initiated by *P. sessilis*, followed by *P. conjugens* and, last, *P. hastisepala*. There was a flowering synchronism among the floral morphs. The species were pollinated by bees in common, including *Melipona* species, and, mainly, *Ariphanarthra palpalis*. The same bees, including *Melipona* species and, mainly *Ariphanarthra palpalis*, pollinated the three species and also visited the morphs of each

species. There was a tendency of one of the morphs to be visited more than the other, especially the long-styled flowers. There were yearly variations in the composition and abundance of the pollinator species. The attractiveness to the flowers seemed to be dependent on the number of inflorescence produced and the open/individual /day flowers. The fructification of the three species was synchronized. In an area of seven hectares, the species population are in isoplethic and the *in vivo* manual pollinations show intra morphs incompatibility. The pollen viability was high (> 64%), in both morphs of the three species. The diameter of the pollen grains of the short-styled flowers was significantly higher, in all the species. The natural fructification was high ( $\geq 53\%$ ) in both morphs of *P. sessilis* and in the short-styled flowers of *P. hastisepala*. In *P. conjugens* and in the long-styled flowers of *P. hastisepala* the natural fructification was low ( $\leq 29\%$ ). There wasn't any significant difference in the number of fruit and seeds between the morphs in *P. sessilis* and *P. conjugens*. The short-styled flowers of *P. hastisepala* produced a number of fruit and seeds significantly higher than the long-styled flowers. *P. conjugens* showed one of the lowest total quantity of seed and its low reproductive success seems to be related to the pollen limitation. In *P. hastisepala*, the occlusion of the stigma, with incompatible pollen, and the damages caused by herbivores to the stigma can be factors related to the low reproductive success of the long-styled flowers. In the analysis of the genetic structure of *P. hastisepala*, the Shannon (I) and Nei ( $H_E$ ) indices and the AMOVA revealed high genetic variation within and among forest fragments. It wasn't obtained significant correlations between the geographic distance and genetic distance. In all the fragments, the reproductive success was higher in the short-styled flowers, not showing a clear correlation to the size of the fragment. The results showed that the reproductive success can be influenced by the quality of the matrix, availability of the pollinators, size of the sampling, and maintenance of the occurrence habitat of the species.

## Introdução geral

Muitos estudos têm demonstrado que a fragmentação de hábitat afeta o sucesso reprodutivo de espécies vegetais (Cunningham, 2000b; Wolf & Harrison, 2001), alterando a estrutura genética (Cascante et al., 2001; Fuchs et al., 2002), o período de floração (Fuchs et al. 2002) e reduzindo a atividade de polinizadores (Kearns & Inouye, 1997; Cunningham, 2000a; Stoner et al., 2002). Nesse último caso, conseqüentemente, há redução da polinização cruzada (Murcia, 1996). A quebra das relações mutualísticas entre flores e polinizadores contribui para o desaparecimento de muitas plantas (Murcia, 1996; Robertson et al. 1999) e a perda da variabilidade genética resulta em depressão endogâmica (Kearns et al., 1998).

A maioria dos estudos sobre os efeitos da fragmentação florestal em espécies vegetais ou animais se concentra em regiões temperadas (Crome, 1997). Embora a quantidade de informações em regiões tropicais venha aumentando, a grande parte das pesquisas tem sido realizada com aves (Ribon, 1998). No Brasil, a maior parte dos trabalhos advém do Projeto “Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais em Manaus” (Powell & Powell, 1987; Stouffer & Bierregard, 1995; Laurence et al., 1998; Funk & Mills, 2003).

A Floresta Atlântica é considerada um dos biomas mais ameaçados e destruído pelo homem, restando, hoje, cerca de 100 mil km<sup>2</sup> de remanescentes florestais, o que corresponde a pouco mais de 1% da área do território brasileiro (Fundação S.O.S Mata Atlântica 2004). Por causa da quase total destruição desse bioma, um Projeto de Lei (PL 285/1999) foi aprovado na Câmara dos Deputados, em 03/12/2003, e "dispõe sobre a utilização e a proteção da Mata Atlântica", definindo critérios para uso e proteção da vegetação (Brasil 2003). Entretanto, estudos sobre a sua flora, especialmente sobre os impactos da fragmentação florestal na biologia reprodutiva dessas plantas, são poucos e recentes (Tabarelli et al., 1999; 2004).

A vegetação original do município de Viçosa, Zona da Mata de Minas Gerais, onde foram escolhidos os fragmentos a serem utilizados no presente estudo, era constituída por florestas contínuas, inseridas nos domínios da Floresta Atlântica (Rizzini, 1992). Atualmente, é composta de pastagens e poucos fragmentos florestais, em diversos estádios sucessionais. A vegetação remanescente é considerada prioritária para investigação científica (cf. Edital PROBIO 02/2001 do Ministério do Meio Ambiente – MMA e Ministério da Ciência e Tecnologia – MCT), pois, além de bastante alterada, foi pouco estudada. Por

exemplo, inexistem estudos sobre o impacto da fragmentação sobre a flora remanescente.

Rubiaceae é a quarta maior família de angiospermas, constituída de cerca de 637 gêneros e de 10.700 espécies, distribuídas, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais (Robbrecht, 1993). No Brasil, ocorrem cerca de 100 gêneros e 1.010 espécies, com distribuição predominante na Floresta Atlântica (Barroso et al., 1991). Essa riqueza em espécies faz dessa família um importante componente do patrimônio genético da biodiversidade brasileira.

Dentre os gêneros de Rubiaceae, destaca-se *Psychotria* L., com 1.600 espécies (Almeida & Alves, 2000), com distribuição pantropical (Burger & Taylor, 1993) e, em sua maioria, distílicas (Barrett, 1992). Além da distília, essas espécies ocorrem principalmente no sub-bosque de florestas tropicais (Gentry & Emmons, 1987), onde há alta diversidade de sistemas reprodutivos, de formas de crescimento, de linhagens filogenéticas e de síndromes de polinização e, por isso, também são facilmente afetadas, de forma negativa, pelo processo de fragmentação (Aizen & Feinsinger, 1994).

Espécies distílicas são aquelas que apresentam posicionamento recíproco de estigmas e anteras entre dois morfos florais diferentes, brevistilo e longistilo, pertencentes a indivíduos distintos (Barrett, 1992). Além da hercogamia recíproca, pode haver diferenças, entre os morfos florais, no número de flores produzidas, no comprimento de corola, na largura e forma de estigmas, nos tamanhos das papilas estigmáticas e das anteras, no tamanho e número de grãos de pólen, na quantidade de néctar produzido e nos tamanhos de frutos e sementes (Ganders, 1979; Bawa et al., 1985; Contreras & Ornelas, 1999; Pereira et al., 2006b).

Na maioria das espécies distílicas há incompatibilidade heteromórfica (Barrett, 1992) e, por isso, somente as polinizações legítimas (brevistila vs. longistila) resultam em frutificação. Portanto, essas espécies são dependentes de polinizadores e a fragmentação pode provocar falhas na polinização entre indivíduos com morfos florais distintos (Wilcock & Neiland, 2002). Segundo Murcia (1996), num processo de fragmentação, a distribuição espacial de indivíduos compatíveis pode ser alterada e o desequilíbrio entre os morfos florais pode provocar a extinção de um deles, que poderá resultar também na extinção do morfo remanescente. Numa população equilibrada, os morfos tendem a apresentar a proporção de 1:1, ou seja, há isoplelia.

Estudos realizados sobre a biologia reprodutiva de espécies distílicas de *Psychotria* envolveram diferentes aspectos, tais como, fenologia de floração (Grandisoli, 1997; Almeida e Alves, 2000; Castro e Oliveira, 2002; Coelho e

Barbosa, 2004; Teixeira e Machado, 2004; Rossi et al., 2005; Ramos e Santos, 2005; Pereira et al., 2006b) e de frutificação e dispersão (Poulin et al., 1999; Almeida et al., 2006), morfometria floral (Castro et al., 2004; Coelho e Barbosa, 2004; Rossi et al. 2005; Pereira et al., 2006b), razão entre os morfos florais (Castro et. al., 2004; Coelho e Barbosa, 2004; Pereira et al., 2006b), polinizadores (Grandisoli, 1997; Castro e Oliveira, 2002; Castro e Araújo, 2004; Coelho e Barbosa, 2004; Teixeira e Machado, 2004; Ramos e Santos, 2006) e sistema de incompatibilidade (Bawa e Beach, 1983; Faivre, 2002; Castro et. al., 2004; Coelho e Barbosa, 2004; Rossi et al., 2004; Pereira et al., 2006b). Esses estudos, entretanto, raramente abordaram aspectos reprodutivos de cada morfo floral, destacando-se o de Castro e Oliveira (2002), que analisaram a floração dos morfos florais, assim como registraram a frequência de seus polinizadores.

A escolha das espécies a serem estudadas, *Psychotria conjugens* Müll. Arg., *P. hastisepala* Müll. Arg. e *P. sessilis* Vell., foi feita tomando como base o estudo florístico realizado com a família Rubiaceae, na região de Viçosa, por Pereira et al. (2006a). De acordo com essas autoras, aquelas espécies de *Psychotria*, dentre as 10 identificadas, são as mais comuns em sub-bosque e apresentam distília (Pereira et al., 2006b).

O objetivo geral, do presente estudo, foi analisar aspectos da biologia reprodutiva dessas três espécies coocorrentes de *Psychotria*, na Estação de Pesquisa Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso (EPTEAMP), maior fragmento florestal do município de Viçosa, Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. Para tanto, foram analisados a fenologia reprodutiva, os polinizadores (capítulo 1) e o sucesso reprodutivo (capítulo 2) de cada morfo de cada espécie. Além disso, foi verificado como a fragmentação florestal vem afetando o sucesso reprodutivo e a estrutura genética de *P. hastisepala* (capítulo 3), em sete fragmentos florestais localizados no município de Viçosa, incluindo a EPTEAMP.

## Referências

- Aizen, M.A.; Feinsinger, P. 1994. Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a chaco dry forest, Argentina. **Ecology** 75: 330-351.
- Almeida, E.M.; Alves, M.A.S. 2000. Fenologia de *Psychotria nuda* e *P. brasiliensis* (Rubiaceae) em uma área de Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 14: 335-346.
- Almeida, E.M.; Costa, P.F.; Buckeridge, M.S.; Alves, M.A.S. 2006. Potential bird dispersers of *Psychotria* in area of Atlantic Forest on Ilha Grande, RJ, Southeastern Brazil: A biochemical analysis of the fruits. **Brazilian Journal Biology** 66:1-8.
- Barrett, S.C.H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: **Evolution and function of heterostyly**. Barret, S.C.H. (ed.). Berlin: Springer-Verlag, pp. 1-29.
- Barroso, G.M.; Peixoto, A.L.; Costa, C.G.; Ichaso, C.L.F.; Guimarães, F.; Lima, H.C. 1991. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Editora da UFV.
- Bawa, K.S.; Beach, J.H. 1983. Self-incompatibility systems in the Rubiaceae of a tropical lowland wet forest. **American Journal of Botany** 70: 1281-1288.
- Bawa, K.S.; Perry, D.R.; Beach, J.H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. **American Journal of Botany** 70: 331-345.
- Brasil. 2003. Projeto de Lei 285/99, dispõe sobre a utilização e a proteção do Patrimônio Nacional da Mata Atlântica e da Serra do Mar, aprovado pela Comissão de Defesa do Consumidor, de Meio Ambiente e das Minorias da Câmara dos Deputados. **Diário Oficial - República Federativa do Brasil** – Publicado no D.O.U de 05/12/2003.
- Burger, W.; Taylor, C.M. 1993. Rubiaceae: Flora Costaricensis. **Field Museum of Natural History** 33: 1-333.
- Cascante, A.; Quesada, M.; Lobo, J. 2001. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. **Conservation Biology** 16: 137-147.
- Castro, C.C; Oliveira, P.E. 2002. Pollination biology of distylous Rubiaceae in the Atlântica Rain Forest, SE Brazil. **Plant Biology** 4: 640-646.
- Castro, C.C; Oliveira, P.E.A.M.; Alves, M.C. 2004. Breeding system and floral morphometry of distylous *Psychotria* L. species in the Atlantic rain forest, SE Brazil. **Plant Biology** 6: 755-760.
- Coelho, C. P.; Barbosa, A.A.A. 2004. Biologia reprodutiva de *Psychotria poeppigiana* Mull. Arg. (Rubiaceae) em mata de galeria. **Acta Botânica Brasília** 18: 481-489.
- Contreras, P.S.; Ornelas, J.F. 1999. Reproductive conflicts of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) a distylous shrub of a tropical cloud forest in Mexico. **Plant Systematics and Evolution** 219: 225-241.
- Cunningham, S. A. 2000a. Depressed pollination in habitat fragments causes low fruit set. **The Royal Society** 267: 1149-1152.
- Cunningham, S. A. 2000b. Effects of habitat fragmentation on the reproductive ecology of four plant species in Mallee woodland. **Conservation Biology** 14: 758-768.
- Crome, F.H.J. 1997. Researching tropical forest fragmentation: shall we keep on doing what we're doing? In: **Tropical forest remnants: ecology, management, ad conservation of fragmented communities**. Lawrance, W. F.; Bierregaard Jr., R.O. (eds.). Chicago: University of Chicago Press pp.44-59.

- Faivre, A.E. 2002. Variation in pollen tube inhibition sites within and among three heterostylous species of a Rubiaceae. **International Journal of Plant Sciences** 163: 783-794.
- Fuchs, E.J.; Lobo, J.A.; Quesada, M. 2002. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. **Conservation Biology** 17: 149-157.
- Fundação S.O.S Mata Atlântica. 2004. <http://www.sosmatatlantica.org.br>, acessado no dia 06/09/2004.
- Funk, W.C.; Mills, L.S. 2003. Potential causes of population declines in forest fragments in an Amazonian frog. **Biological Conservation** 111: 205-214.
- Ganders, F.R. 1979. The biology of heterostyly. **New Zealand Journal of Botany** 17: 607-635.
- Gentry, A.H.; Emmons, L.H. 1987. Geographical variation in fertility, phenology, and composition of the understory of neotropical forest. **Biotropica** 19: 216-227.
- Grandisoli, E.A.C. 1997. **Biologia reprodutiva e estrutura da população de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) em um fragmento de mata secundária em São Paulo (SP)**. São Paulo, USP. (Dissertação de mestrado)
- Kearns, C.A.; Inouye, D.W. 1997. Pollinators, flowering plants, and conservation biology. **Bioscience** 47: 297-307.
- Kearns, C.A.; Inouye, D.W.; Waser, N.M. 1998. Endangered mutualism: The conservation of plant-pollinator interactions. **Annual Review of Ecology and Systematics** 29: 83-112.
- Laurence, S.G.; Ferreira, L.V.; Rankin-de-Merona, J.M.; Laurence, S.G.; Hutchings, R.W.; Lovejoy, T.E. 1998. Effects of forest fragmentation on recruitment patterns in Amazonian tree communities. **Conservation Biology** 12: 460-464.
- Murcia, C. 1996. Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. In: **Forest patches in tropical landscapes**. Schellas, J.; Greenberg, R. (eds.). Washington: Island Press, pp. 19-36.
- Pereira, Z.V.; Carvalho-Okano, R.M.; Garcia, F.C.P. 2006a. Rubiaceae Juss. da Reserva Florestal Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasileira** 20: 207-224.
- Pereira, Z.V.; Vieira, M.F.; Carvalho-Okano, R.M. 2006b. Fenologia de floração, morfologia floral e sistema de incompatibilidade em espécies distílicas de Rubiaceae em fragmento florestal do sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica** 29: 471-480.
- Poulin, B.; Wrigt, S.; Lefebvre, G.; Calderon, O. 1999. Interspecific synchrony and asynchrony in the phenologies of congeneric bird-dispersed plants in Panama. **Journal Tropical Ecology** 15: 213-217.
- Powell, A.H.; Powell, G.V.N. 1987. Population dynamics of male euglossine bees in Amazonian forest fragments. **Biotropica** 19: 176-179.
- Ramos, F.N.; Santos, F.A.M. 2005. Phenology of *Psychotria tenuinervis* (Rubiaceae) in Atlantic Forest fragments: fragment and habitat scales. **Canadian Journal of Botany** 83:1305-1316.
- Ramos, F.N.; Santos, F.A.M. 2006. Floral visitors and pollination of *Psychotria tenuinervis* (Rubiaceae): Distance from the anthropogenic and natural edges of Atlantic Forest Fragment. **Biotropica** 38:383-389.
- Ribon, R. 1998. **Fatores que influenciam a distribuição da avifauna em fragmentos de Mata Atlântica nas montanhas de Minas Gerais**. Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais, 116p. Dissertação de Mestrado.
- Robbrecht, E. 1993. Introduction to advances in Rubiaceae macrosystematics. **Opera Botanica Belgica** 6: 7-18.
- Robertson, A.W.; Kelly, D.; Ladley, J.J.; Sparrow, A.D. 1999. Effects of pollinator loss on endemic New Zealand mistletoes (Loranthaceae). **Conservation Biology** 13: 499-508.

- Rossi, A.A.B.; Oliveira, L.O.; Vieira, M.F. 2005. Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stckes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 28:285-294.
- Stoner, K.E.; Quesada, M.; Rosas-Guerrero, V. 2002. Effects of forest fragmentation on the Colima long-nosed bat (*Musonycteris harrisoni*) foraging in tropical dry forest of Jalisco, México. **Biotropica** 34: 462-467.
- Stouffer, P.C.; Bierregaard, R.O. Jr. 1995. Effects of forest fragmentation on understory hummingbird in Amazonian Brazil. **Conservation Biology** 9: 1085-1094.
- Tabarelli, M.; Mantovani, W.; Peres, C.A. 1999. Effects of habitat fragmentation on plant guild structure in the montane Atlantic Forest of southeastern Brazil. **Biological Conservation** 91: 119-127.
- Tabarelli, M.; Silva, J.M.C.; Gascon, C. 2004. Forest fragmentation, synergisms and the impoverishment of neotropical forests. **Biodiversity and Conservation** 13: 1419-1425.
- Teixeira, L.A.G.; Machado, I.C. 2004. Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). **Acta Botânica Brasílica** 18: 853-862.
- Wilcock, C.; Neiland, R. 2002. Pollination failure in plants: Why it happens and when it matters. **Trends in Plant Science** 7: 270-277.
- Wolf, A.T.; Harrison, S.P. 2001. Effects of habitat size and patch isolation on reproductive success of the serpentine morning glory. **Conservation Biology** 15: 111-121.

## CAPÍTULO 1

**Fenologia reprodutiva e polinizadores de três espécies distílicas de *Psychotria* (Rubiaceae) em fragmento florestal do sudeste brasileiro**

## Resumo

Foram objetivos analisar a fenologia reprodutiva e identificar os visitantes florais de três espécies distílicas e coocorrentes de *Psychotria*, *P. conjugens* Müll. Arg., *P. hastisepala* Müll. Arg. e *P. sessilis* Vell., no município de Viçosa, Zona da Mata de Minas Gerais, em dois episódios reprodutivos, em 2004/2005 e 2005/2006. Buscou-se responder às seguintes questões: Há sincronia de floração entre os morfos florais de cada espécie? Há sincronia de floração e de frutificação entre as espécies? Quais são os visitantes florais e, dentre eles, os polinizadores? Os polinizadores e a sua frequência de visitação por morfo floral, em cada espécie, são semelhantes? Há polinizadores comuns entre as espécies? As espécies apresentaram floração seqüencial e anual, durante a estação chuvosa. *P. sessilis* floresceu de setembro a dezembro, seguida por *P. conjugens*, de novembro a janeiro, e por *P. hastisepala*, de janeiro a abril. Houve sincronia de floração entre os morfos florais das espécies estudadas. *P. sessilis* apresentou dois picos de floração, em cada episódio reprodutivo, e esses picos foram intercalados por sete a 18 dias, nos quais a produção de flores foi nula, caracterizando dois pulsos de floração. Foi a espécie, dentre as estudadas, que apresentou maior abundância de flores por episódio reprodutivo. *P. conjugens* apresentou dois picos de floração no primeiro episódio reprodutivo; no segundo episódio ocorreu apenas um pico. *P. hastisepala*, em ambos os episódios de floração, apresentou somente um pico. As espécies foram polinizadas por abelhas em comum, incluindo espécies de *Melipona*, e, principalmente, *Ariphanarthra palpalis*, todas típicas de florestas da Zona da Mata mineira. Os morfos de cada espécie foram visitados pelas mesmas abelhas, em cada episódio reprodutivo. Entretanto, houve tendência de um dos morfos ser mais visitado que o outro, especialmente o longistilo, e variações anuais na composição e na abundância de espécies de polinizadores. Os maiores números de espécies de abelhas e as maiores porcentagens de frequência de visitação foram registrados em flores de *P. sessilis*, seguida pelas de *P. conjugens* e, por último, *P. hastisepala*. A atratividade às flores pareceu ser dependente dos números de inflorescências produzidas e de flores abertas/dia/indivíduo e da disponibilidade de recursos florais e deve ser um dos fatores que determinou a diversidade de polinizadores. A frutificação das espécies, diferentemente da floração, foi sincrônica, principalmente em março e abril, e a sincronia parece ser uma estratégia que deve auxiliar no processo de dispersão ornitócorica, aumentando a atratividade e a disponibilidade de frutos aos pássaros frugívoros.

## Fenologia reprodutiva e polinizadores de três espécies distílicas de *Psychotria* (Rubiaceae) em fragmento florestal do sudeste brasileiro

### Introdução

*Psychotria* L. engloba 1.600 espécies (Almeida e Alves, 2000), de distribuição pantropical (Burger e Taylor, 1993). A distília é comum às espécies desse gênero (Barrett, 1992), assim como sua ocorrência em sub-bosque de florestas tropicais (Gentry e Emmons, 1987). Na região de Viçosa, Zona da Mata do Estado de Minas Gerais e local do presente estudo, foram registradas 10 espécies distílicas de *Psychotria*, todas em sub-bosque de um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual (Pereira et al., 2006a; b).

Estudos sobre a floração e a frutificação constituem uma importante ferramenta para a compreensão de fatores reguladores dessas fenofases (Martin-Gajardo e Morellato, 2003). Por exemplo, variáveis climáticas, tais como, radiação solar, umidade e temperatura ambiente, podem influenciar no período de floração e, conseqüentemente, na atividade de polinizadores (van Schaick et al., 1993; Herrera, 1995). Em espécies de *Psychotria*, esses estudos mostraram que a floração ocorre, predominantemente, durante a estação chuvosa (Grandisoli, 1997; Almeida e Alves, 2000; Castro e Oliveira, 2002; Coelho e Barbosa, 2004; Rossi et al., 2005; Pereira et al., 2006b) e que são, comumente, entomófilas (Taylor, 1997; Castro e Oliveira, 2002). Registraram-se, como polinizadores abelhas (Castro e Oliveira, 2002; Teixeira e Machado, 2004; Ramos e Santos, 2006) e borboletas (Almeida e Alves, 2000; Coelho e Barbosa, 2004) e, em alguns casos, beija-flores (Sazima et al., 1996; Almeida e Alves, 2000; Castro e Araújo, 2004).

Em Rubiaceae, as sincronias de floração e de frutificação de algumas espécies, inclusive de *Psychotria*, têm sido relacionadas à atração de polinizadores e de dispersores, respectivamente (Koptur et al. 1988; Martin-Gajardo e Morellato, 2003; Almeida e Alves, 2000; Poulin et al., 1999; Almeida et al., 2006). Por outro lado, foi verificado que espécies coocorrentes de *Psychotria* apresentam floração seqüencial (Almeida e Alves, 2000; Castro e Oliveira, 2002; Pereira et al., 2006b) e polinizadores comuns, sem que haja competição interespecífica (Almeida e Alves, 2000; Castro e Oliveira, 2002). Nesse caso, os atributos florais das espécies envolvidas, além do hábitat, são semelhantes e parecem promover a “série de reposição” (*sensu* Macior 1971), ou seja, espécies distintas resultam, em conjunto, numa “única” floração, por um longo período durante o ano.

São escassos os estudos sobre a floração dos morfos florais, em espécies distílicas de Rubiaceae, assim como a identificação e freqüência de polinizadores por morfo (veja Castro e Oliveira, 2002). Entretanto, o sucesso reprodutivo de cada morfo pode ser dependente da atratividade (Kearns e Inouye, 1997), fator relacionado à quantidade de flores disponíveis aos polinizadores, e da freqüência e comportamento do polinizador (Cane, 2001; Donaldson et al., 2002). Diante do exposto, no presente estudo, foram objetivos analisar a fenologia reprodutiva e identificar os visitantes florais de três espécies distílicas e coocorrentes de *Psychotria*, *P. conjugens* Müll. Arg., *P. hastisepala* Müll. Arg. e *P. sessilis* Vell., e responder às seguintes questões:

- (1) Há sincronia de floração entre os morfos florais de cada espécie?
- (2) Há sincronia de floração e de frutificação entre as espécies?
- (3) Quais são os visitantes florais e, dentre eles, os polinizadores?
- (4) Os polinizadores e a sua freqüência de visitação por morfo floral, em cada espécie, são semelhantes?
- (5) Há polinizadores comuns entre as espécies?

## **Material e métodos**

**Área de estudo e espécies estudadas** - O estudo foi desenvolvido na Estação de Pesquisa Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso (EPTEAMP), fragmento florestal do município de Viçosa (20°45'S e 42°51'W), Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, com cerca de 650m de altitude. O clima de Viçosa é caracterizado por apresentar temperatura média anual de 19°C, precipitação anual de 1300 a 1400mm, com o período de maior precipitação ocorrendo entre os meses de outubro a março (Fig. 1), e umidade relativa do ar de 80 a 85%. Durante o período de estudo (set/2004 a abril/2005 e set/2005 a abril/2006) observou-se que a maior média mensal de precipitação ( $\bar{X} = 5,22\text{mm}$ ) concentrou-se nos meses de dezembro a março, período em que também foram observadas as temperaturas mais elevadas ( $\bar{X} = 21,44^\circ\text{C}$ ). Os dados climatológicos foram fornecidos pela Estação Meteorológica da Universidade Federal de Viçosa, a qual localiza-se a 5 Km da área de estudo.

A vegetação original de Viçosa está inserida nos domínios da Floresta Atlântica (Rizzini, 1992) e foi classificada, por Veloso et al. (1991), como Floresta Estacional Semidecidual Submontana. A EPTEAMP é uma área de preservação ambiental, de regeneração secundária, com cerca de 168 ha e está vinculada ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa.

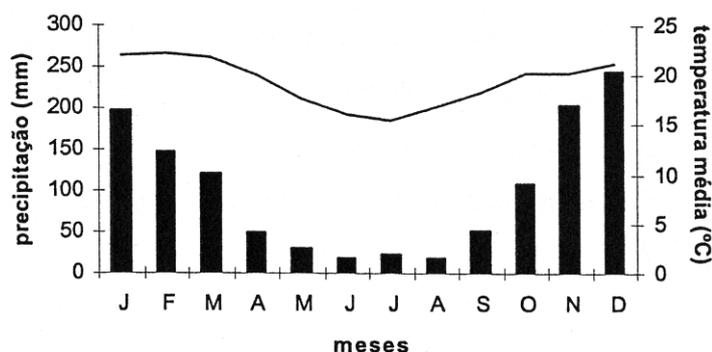


Figura 1. Precipitação e temperatura média, ao longo do ano em Viçosa, Minas Gerais (média de 1961 a 1990). Fonte: Marangon (1999)

*P. conjugens* e *P. hastisepala* são subarbustos de 1,0 a 2,5 m, ambas com distribuição restrita ao território nacional, ocorrendo do sul do Pará até o Rio Grande do Sul (Andersson, 1992). *P. sessilis* é arbusto de 1,5 a 3,5 m de altura e, além do Brasil, ocorre em vários outros países sul-americanos (Andersson, 1992). Todas habitam o sub-bosque e são distílicas (Fig. 2), ou seja, apresentam hercogamia recíproca e auto-incompatibilidade intramorfo (Pereira et al., 2006b). As flores das três espécies apresentam antese diurna, corola tubulosa (Fig. 2), de cor branca ou creme e têm duração de um dia (Pereira et al., 2006b). Os frutos são drupáceos, azuis ou atropurpúreos na maturidade e ornitocóricos (*sensu* Pijl, 1982). Cada fruto produz de uma a duas sementes (obs. pes.). Espécimes-testemunho encontram-se depositados no Herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa (nos. 26.963, 26.964 e 26.974).

**Fenologia reprodutiva** - Os dados fenológicos foram registrados semanalmente, em dois episódios reprodutivos consecutivos, entre os anos de 2004 e 2005 e de 2005 e 2006. No primeiro episódio, foram etiquetados 19 indivíduos com flores brevistilas (B) e 23 com flores longistilas (L) em *P. sessilis*, 09 B e 04 L em *P. conjugens* e 22 B e 18 L em *P. hastisepala*. No segundo episódio, foram etiquetados 10 indivíduos B e 10 L, de cada espécie. Nesses indivíduos, nos dois episódios de floração, foram registrados os números de inflorescências/indivíduo e de flores abertas/indivíduo/dia, exceto em *P. sessilis*. Nesta espécie, dado ao seu porte e ao alto número de inflorescências e de flores produzidas durante a floração, esses registros foram feitos em três ramos anuais, por indivíduo, escolhidos aleatoriamente. O número de flores/inflorescência foi registrado somente no primeiro episódio de floração (N = 30, para cada espécie e morfo), em todas as espécies estudadas.

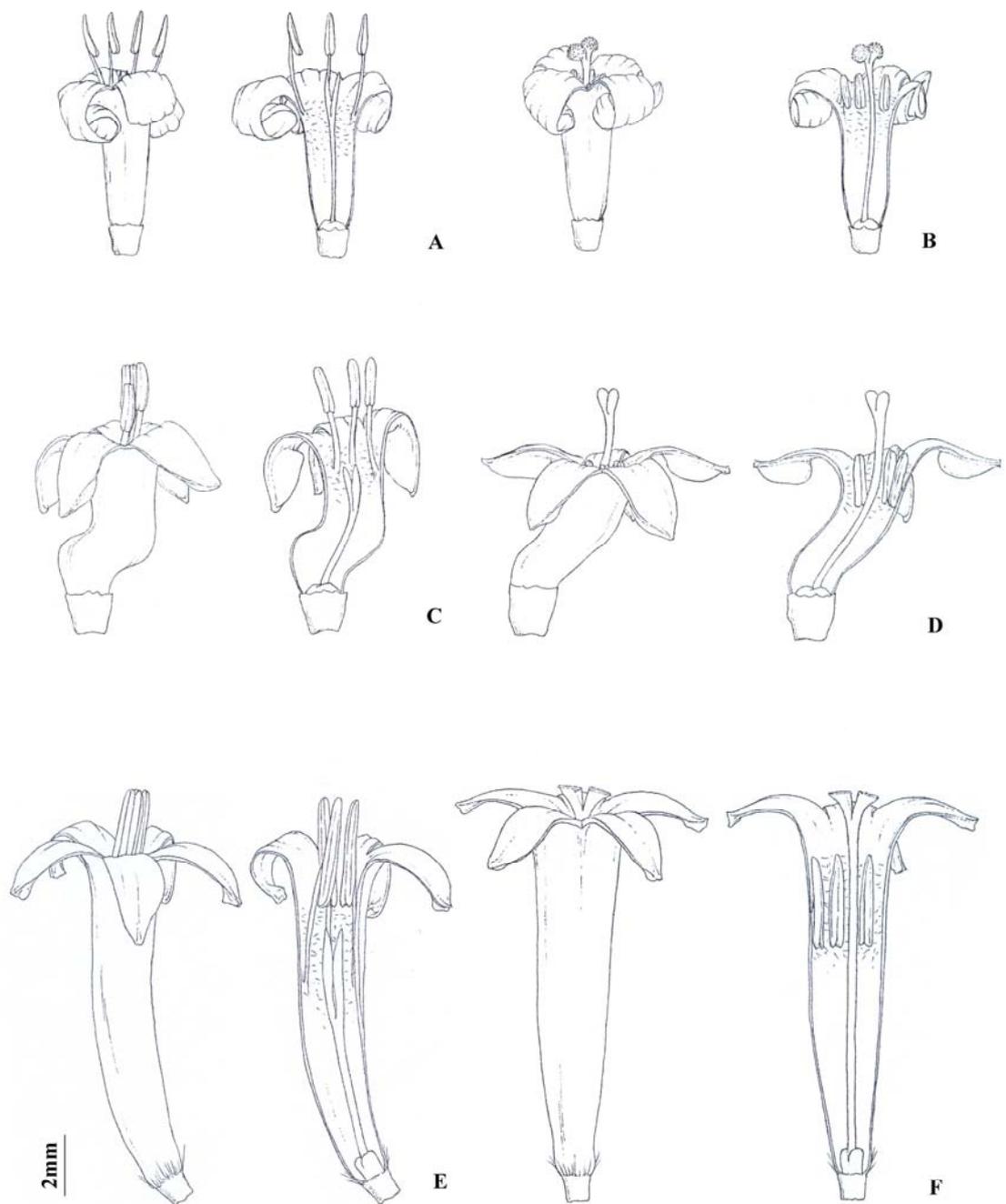


Figura 2. Flores de *Psychotria*: *P. sessilis*, flores brevistilas (A) e longistilas (B); *P. conjugens*, flores brevistilas (C) e longistilas (D); *P. hastisepala*, flores brevistilas (E) e longistilas (F).

Em todas as espécies foi registrado o intervalo entre o início da frutificação, caracterizado pela dilatação de ovários, e a maturação dos frutos, caracterizada pela alteração da coloração do pericarpo (do verde para o azul ou atropurpúreo).

**Visitantes florais** - Os visitantes florais foram coletados durante o trabalho de campo. Foram mortos e, posteriormente, foram montados em alfinete entomológico, etiquetados e identificados com auxílio de especialista. Espécimes-testemunho foram depositados no Museu Regional de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (UFVB).

No pico de floração, de cada espécie, foi realizada a freqüência de visitação em flores de ambos os morfos, em indivíduos do sub-bosque, distantes no mínimo 30 metros da margem do fragmento, minimizando, dessa forma, os efeitos de borda. Para tanto, nos dois eventos reprodutivos (2004/2005 e 2005/2006), no período de 7:00 às 15:00h, por três dias consecutivos em *P. sessilis* e quatro dias consecutivos em *P. hastisepala*, foram identificados os visitantes florais e quantificadas as suas visitas. As contagens foram feitas em oito blocos de 30 minutos, alternados por morfo floral, totalizando 12 horas de observação/ano para *P. sessilis* e 16 horas de observação/ano para *P. hastisepala*. Os visitantes florais de *P. conjugens* foram identificados e quantificados somente em 2005/2006 (12 horas de observação).

Para definir os polinizadores, dentre os visitantes florais, foi observado o comportamento de visita de cada um, isto é, se contatavam estigmas e anteras (visitas legítimas) e o recurso floral que coletavam (pólen e, ou néctar).

**Análise estatística** - Análises estatísticas foram conduzidas usando o Programa "General Linear Model", no software Statistica versão 5.5 (StatSoft, 2000). Nas Análises de Variância foi aplicado o teste One - way ANOVA (Zar, 1999).

## **Resultados**

**Fenologia reprodutiva** - Dentre as espécies estudadas, *P. sessilis* foi a primeira a florescer, entre setembro e dezembro/2004 (Fig. 3A) e entre setembro e novembro/2005 (Fig. 3B),

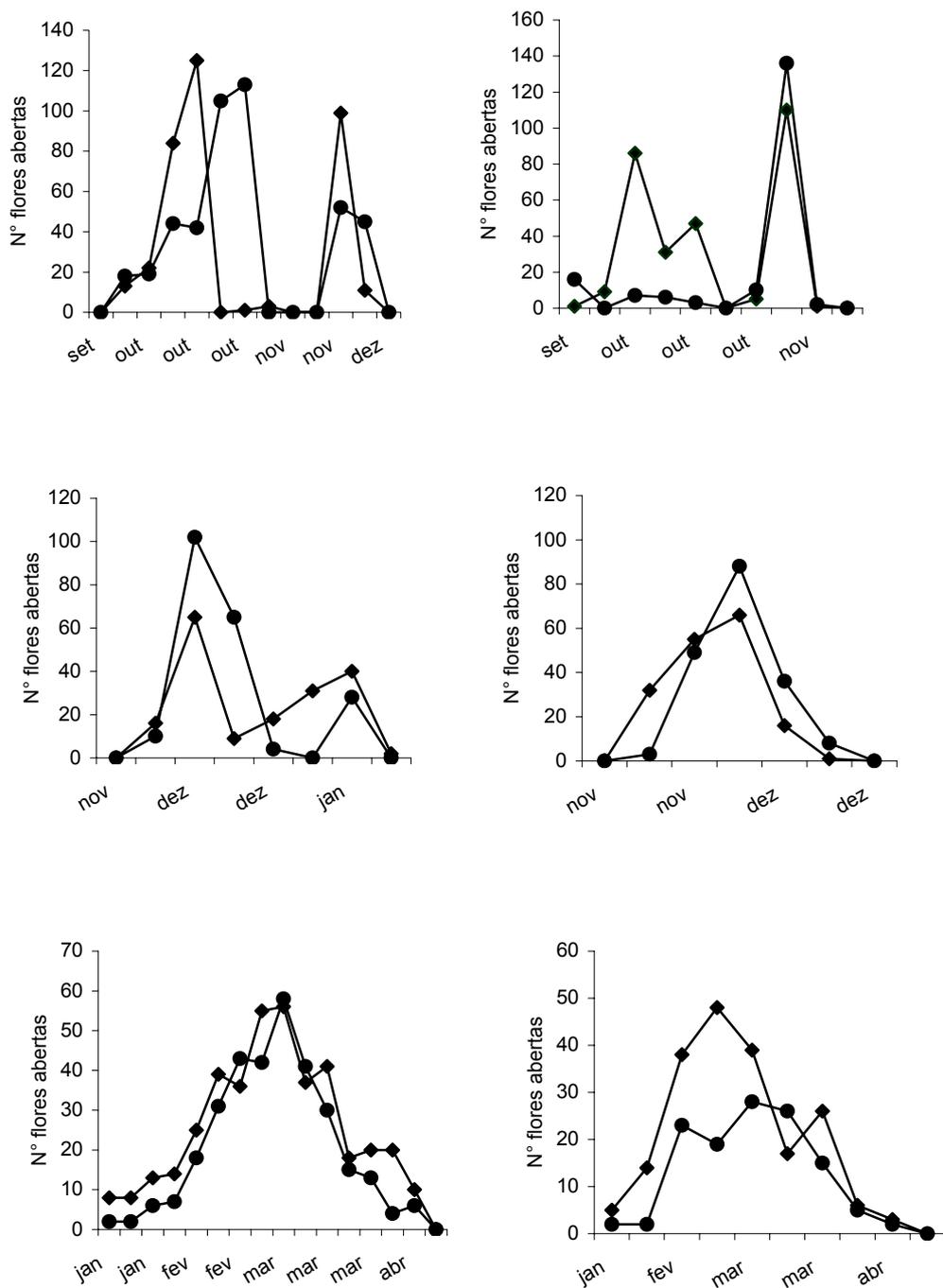


Figura 3. Floração de morfos brevistilos (♦) e longistilos (●) em espécies de *Psychotria*: *P. sessilis*, de setembro a dezembro/2004 (A) e de setembro a novembro/2005 (B); *P. conjugens*, de novembro/2004 a janeiro/2005 (C) e de novembro e dezembro/2005 (D); e *P. hastisepala*, de janeiro a abril/2005 (E) e de janeiro a abril/2006 (F), na Estação de Pesquisa Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais.

durante a estação chuvosa (Fig. 1). Em ambos os episódios, houve sincronia de floração entre os morfos florais e dois picos de floração; em 2004, os picos foram em outubro e em dezembro e em 2005 ocorreu em outubro e em novembro (Fig. 3A, B). Em cada ano, esses picos foram intercalados por sete a 18 dias, nos quais a produção de flores foi nula, caracterizando dois pulsos de floração (Fig. 3A, B). Nos dois episódios de floração, não houve diferença significativa entre os morfos quanto aos números médios de inflorescências/indivíduo ( $F = 0,60$ ,  $p = 0,44$  em 2004 e  $F = 0,26$ ,  $p = 0,61$  em 2005), de flores/inflorescência ( $F = 2,56$ ,  $p = 0,11$ ) e de flores abertas/indivíduo/dia ( $F = 0,013$ ,  $p = 0,90$  em 2004 e  $F = 0,29$ ,  $p = 0,6$  em 2005) (Tabela 1). Apesar da sincronia de floração entre os morfos e da semelhança entre eles nos valores médios dos parâmetros citados anteriormente, houve tendência de um dos morfos produzir mais flores/pico/ano (Fig. 3, Tabela 1). Em cada ano, a produção de flores/morfo/pico não apresentou diferença significativa ( $F = 0,54$ ,  $p = 0,46$  no primeiro pico de 2004 e  $F = 1,22$ ,  $p = 0,28$  no segundo;  $F = 1,9$ ,  $p = 0,18$  no primeiro pico de 2005 e  $F = 2,23$ ,  $p = 0,15$ , no segundo). Entretanto, houve diferença significativa no número total de flores produzidas nos picos ( $F = 4,05$ ,  $p = 0,04$ ), em 2004, e não houve diferença ( $F = 1,87$ ,  $p = 0,17$ ), em 2005. A produção total de flores/ano foi maior em 2004; essa variação deve estar relacionada ao número de indivíduos amostrados em cada ano (Tabela 1).

*P. conjugens* iniciou a floração em novembro/2004 e 2005, com pouca sobreposição com a floração de *P. sessilis*, e o término ocorreu em janeiro/2005 e dezembro/2005, respectivamente (Fig. 3C, D), também durante a estação chuvosa (Fig. 1). No primeiro episódio de floração, ocorreram dois picos, em novembro e em janeiro, com queda de produção de flores dos dois morfos entre os picos (Fig. 3C), de modo semelhante ao registrado em *P. sessilis*. Em 2005, entretanto, houve apenas um pico de floração, em dezembro (Fig. 3D). Em ambos os episódios, houve sincronia de floração entre os morfos florais (Fig. 3C, D). Em 2004, houve diferença significativa entre os morfos florais no número médio de inflorescências/indivíduo ( $F = 13,86$ ,  $p = 0,004$ , Tabela 2) e não houve diferença significativa para esse parâmetro em 2005 ( $F = 0,16$ ,  $p = 0,68$ , Tabela 2). O número médio de flores/inflorescência foi significativamente maior no morfo longistila ( $F = 35,19$ ,  $p = 0,0001$ ), assim como o número médio de flores abertas/indivíduo/dia, em 2004 ( $F = 8,15$ ,  $p = 0,03$ ); em 2005, não houve diferença significativa para esse último parâmetro ( $F = 2,23$ ,  $p = 0,14$ ) (Tabela 2). Em 2004, houve diferença significativa na produção de flores/morfo no primeiro pico ( $F = 26,5$ ,  $p = 0,0001$ ), ou seja, foi produzido um maior número de flores longistilas; não houve diferença no segundo pico ( $F = 2,42$ ,  $p = 0,22$ ) (Fig. 3C, Tabela 2). O número total de flores

Tabela 1. Números médios e o desvio padrão de inflorescências/indivíduo, de flores/inflorescência e de flores abertas/indivíduo/dia e o número de flores produzidas/pico de floração, nos anos de 2004 e 2005, em *Psychotria sessilis*, na Estação de Pesquisa Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais. B = brevistila, L = longistila, ind. = indivíduo.

Ano/ Morfo (no. ind.)	Inflorescências/ indivíduo	Flores/ inflorescência	Flores abertas/ indivíduo/ dia	Flores/ pico		Total de flores/ morfo
	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	1°	2°	
2004/ B (19)	51,34 ± 40,63	9,46 ± 2,64	20,40 ± 22,20	244	144	388
L (23)	68,08 ± 80,67	7,86 ± 1,56	21,30 ± 25,50	341	97	438
Total de flores/ pico e total geral				585	241	826
2005/ B (10)	40,00 ± 25,01	-	11,44 ± 14,80	174	116	290
L (10)	45,50 ± 44,79	-	07,03 ± 16,32	32	148	180
Total de flores/ pico e total geral				206	264	470

Tabela 2. Números médios e o desvio padrão de inflorescências/indivíduo, de flores/inflorescência e de flores abertas/indivíduo/dia e o número de flores produzidas/pico de floração, nos anos de 2004 e 2005, em *Psychotria conjugens*, na Estação de Pesquisa Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais. B = brevistila, L = longistila, ind. = indivíduo.

Ano/ Morfo (no. ind.)	Inflorescências/ indivíduo	Flores/ inflorescência	Flores abertas/ indivíduo/ dia	Flores/ pico		Total de flores/ morfo
	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	1°	2°	
2004/ B (9)	19,65 ± 1,06	12,30 ± 7,43	14,07 ± 5,70	139	42	181
L (4)	18,25 ± 3,50	22,68 ± 8,83	26,58 ± 6,80	181	28	209
Total de flores por pico e geral				320	70	390
2005/ B (10)	2,90 ± 2,51	-	4,22 ± 2,25	170	-	170
L (10)	3,30 ± 1,76	-	4,44 ± 3,51	184	-	184
Total de flores por pico e geral				354	-	354

Tabela 3. Números médios e o desvio padrão de inflorescências/indivíduo, de flores/inflorescência e de flores abertas/indivíduo/dia e o número de flores produzidas/pico de floração, nos anos de 2005 e 2006, em *Psychotria hastisepala*, na Estação de Pesquisa Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais. B = brevistila, L = longistila, ind. = indivíduo.

Ano/ Morfo (no. ind.)	Inflorescências/ indivíduo	Flores/ inflorescência	Flores abertas/ indivíduo/ dia	Flores/ pico
	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	
2005/ B (22)	14,20 ± 06,54	6,91 ± 2,77	2,78 ± 2,41	410
L (18)	15,27 ± 15,10	9,03 ± 1,88	2,75 ± 2,28	322
Total de flores				732
2006/ B (10)	17,10 ± 4,09	-	2,14 ± 2,70	193
L (10)	13,30 ± 5,33	-	1,35 ± 1,60	122
Total de flores				315

produzidas/morfo, em 2004, não apresentou diferença significativa ( $F = 1,62$ ,  $p = 0,20$ ); entretanto, a produção de flores foi significativamente maior no primeiro pico ( $F = 31,44$ ,  $p = 0,0001$ ). Em 2005, a produção de flores dos dois morfos foi semelhante, isto é, não houve diferença significativa ( $F = 0,007$ ,  $p = 0,93$ ) (Fig. 3D, Tabela 2). Nesse ano, apesar do maior número de indivíduos analisados (Tabela 2), houve uma acentuada queda na produção de inflorescências/indivíduo e de flores abertas/indivíduo/dia.

*P. hastisepala* iniciou a floração em janeiro/2005 ou fevereiro/2006 (Fig. 3E, F), também durante a estação chuvosa (Fig. 1), com pouca ou nenhuma sobreposição com a floração de *P. conjugens*. Dentre as espécies estudadas, foi a que apresentou floração menos abundante (Fig. 3E, F). O término ocorreu em abril de 2005 e de 2006 (Fig. 3E, F), início da estação seca (Fig. 1). Observou-se, em ambos os episódios de floração, somente um pico, em março, e houve sincronia de floração entre os morfos (Fig. 3E, F). Não houve diferença significativa entre os morfos nos números médios de inflorescências/indivíduo ( $F = 0,28$ ,  $p = 0,56$  em 2005;  $F = 4,28$ ,  $p = 0,053$  em 2006) e de flores/inflorescência ( $F = 2,44$ ,  $p = 0,12$ ) (Tabela 3). Em 2005, não houve diferença significativa entre os morfos no número médio de flores abertas/indivíduo/dia ( $F = 1,06$ ,  $p = 0,30$ ); em 2006, este parâmetro foi significativamente maior no morfo brevistila ( $F = 5,6$ ,  $p = 0,018$ ) (Tabela 3). Em 2005, a produção de flores/morfo não foi significativamente diferente ( $F = 1,06$ ,  $p = 0,30$ ), mas houve diferença em 2006 ( $F = 5,62$ ,  $p = 0,018$ ). A produção de flores/ano foi significativamente maior no ano de 2005 ( $F = 16,53$ ,  $p = 0,0006$ ); essa variação deve estar relacionada ao número de indivíduos amostrados em cada ano (Tabela 3).

A frutificação de *P. sessilis* e de *P. conjugens* iniciou em janeiro e os frutos encontravam-se maduros, respectivamente, em março de 2005 e de 2006 e em março/abril de 2005 e de 2006. A frutificação de *P. hastisepala* iniciou em março e abril de 2005 e os frutos encontravam-se maduros cerca de um ano depois, em fevereiro/março de 2006, concomitantemente à floração do ano.

**Visitantes florais** - Nas espécies estudadas foram registrados como visitantes florais insetos das ordens Hymenoptera (abelhas), Lepidoptera (borboletas), Diptera (moscas) e Coleoptera (besouros) (Tabelas 4, 5 e 6). Dentre esses insetos, principalmente as abelhas nativas *Ariphanarthra palpalis*, *Melipona bicolor*, *M. mondury*, *M. quadrifasciata* e *Trichocerapis mirabilis* e a abelha exótica *Apis mellifera* foram consideradas polinizadoras, devido ao seu comportamento de visita e à frequência de visita (Tabelas 4, 5 e 6). Durante as visitas, em busca de

Tabela 4. Frequência de visitação de insetos em flores de *Psychotria sessilis*, nos anos de 2004 e 2005, na Estação de Pesquisa Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais.

Insetos (Ordem/ Família/ Espécie)	Número de visitas (%)					
	2004			2005		
	Brevistila	Longistila	Total/ inseto	Brevistila	Longistila	Total/ inseto
Hymenoptera/ Apidae/ <i>Apis mellifera</i> Lepeletier , 1836	95 (19,15)	99 (16,84)	194 (17,90)	70 (19,89)	53 (08,53)	123 (12,64)
<i>Melipona bicolor</i> Lepeletier,1836	144 (29,03)	69 (11,73)	213 (19,65)	105 (29,83)	229 (36,88)	334 (34,33)
<i>Melipona mondury</i> Smith, 1863	29 (05,85)	41 (06,97)	70 (06,46)	-	-	-
<i>Melipona quadrifasciata</i> Lepeletier, 1836	207 (41,73)	367 (62,41)	574 (52,95)	105 (29,83)	236 (38,00)	341 (35,04)
Halictidae/ ♀ <i>Ariphanarthra palpalis</i> Moure, 1951	-	-	-	62 (17,61)	87 (14,00)	149 (15,31)
<i>Augochlora</i> sp.	-	-	-	10 (02,84)	16 (02,58)	26 (02,67)
Lepidoptera/ Nymphalidae/ Morfo-espécie 1	21 (04,23)	12 (02,04)	33 (03,04)	-	-	-
Total de visitas/ morfo e de visitas/ ano	496	588	1084	352	621	973

Tabela 5. Frequência de visitação de insetos em flores de *Psychotria conjugens*, em 2005, na Estação de Pesquisa Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais.

Insetos (Ordem/ Família/ Espécie)	Número de visitas (%)		
	Brevistila	Longistila	Total/ inseto
Hymenoptera/ Apidae/ <i>Melipona bicolor</i> Lepeletier,1836	14 (18,42)	281 (41,32)	295 (39,02)
<i>Melipona quadrifasciata</i> Lepeletier,1836	16 (21,05)	22 (3,23)	38 (05,02)
Halictidae/ ♀ <i>Ariphanarthra palpalis</i> Moure, 1951	13 (17,10)	352 (51,80)	365 (48,30)
Díptera/ Morfo espécie 1/	13 (17,10)	10 (1,50)	23 (03,04)
Coleóptera/ Morfo espécie 1/	9 (11,84)	11 (1,61)	20 (02,65)
Total de visitas/ morfo e de visitas/ ano	76	680	756

Tabela 6. Frequência de visitação de insetos em flores de *Psychotria hastisepala*, nos anos de 2005 e 2006, na Estação de Pesquisa Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais.

Insetos (Ordem/ Família/ Espécie)	Número de visitas (%)					
	2005			2006		
	Brevistila	Longistila	Total/ inseto	Brevistila	Longistila	Total/ inseto
Hymenoptera/ Apidae/ <i>Melipona mondury</i> Smith, 1863	-	-	-	2 (6,45)	12 (30,00)	14 (19,71)
<i>Trichocerapis mirabilis</i> (Smith 1865)	11 (44,00)	16 (48,48)	27 (46,55)	-	-	-
Halictidae/ ♂ <i>Ariphanarthra palpalis</i> Moure, 1951	3 (12,00)	4 (12,12)	7 (28,00)	-	-	-
<i>Augochlora</i> sp.	-	-	-	3 (9,70)	6 (15,00)	9 (12,68)
Lepidoptera/ Nymphalidae/ Morfo-espécie 1	7 (28,00)	8 (24,24)	15 (25,90)	-	-	-
Diptera/ Morfo espécie 1/	-	-	-	22 (70,96)	12 (30,00)	34 (47,89)
Coleoptera/ Morfo espécie 1/	4 (16,00)	5 (15,15)	9 (15,51)	4 (13,00)	10 (25,00)	14 (19,71)
Total de visitas/ morfo e de visitas/ ano	25	33	58	31	40	71

néctar, essas abelhas introduziam parte do corpo no tubo floral e, desse modo, contatavam os estigmas e as anteras, em ambos os morfos, comportamento que favorece polinizações legítimas. Durante uma onda de visitação, geralmente todas as flores abertas do indivíduo eram visitadas e, nesse caso, polinizações ilegítimas geitonogâmicas (*sensu* Richards, 1997) tendem a ocorrer. As visitas às flores ocorreram principalmente no período da manhã, entre 7h:00 e 10h:00, mas prolongaram-se até às 14h:30min, ocasião em que as flores, de todas as espécies, começavam a senescer.

Em *P. sessilis* foram registradas seis espécies de abelhas e três delas, *M. quadrifasciata*, *M. bicolor* e *Apis mellifera*, foram comuns nos dois anos de estudo e atuaram como importantes polinizadores, pois apresentaram as maiores frequências de visitação nos dois morfos florais (Tabela 4). *M. quadrifasciata* e *M. bicolor* realizaram 72,60 e 69,37% do total do número de visitas/inseto em 2004 e

2005, respectivamente (Tabela 4). A abelha exótica *A. mellifera* apresentou valores percentuais do total de visitas/inseto/ano inferiores a 18,0% (Tabela 4). As visitas das demais abelhas e de uma borboleta ocorreram em apenas um dos anos e representaram baixas porcentagens (Tabela 4), exceto *Ariphanarthra palpalis*; essa abelha visitou ambos os morfos, perfazendo cerca de 15% do total de visitas/inseto em 2005 (Tabela 4). Houve a tendência das flores longistilas receberem um maior número de visitas; em 2005, essas flores receberam cerca de 1,8 vezes mais visitas que as brevistilas (Tabela 4).

Das 12 horas de observação/ano, para a contagem dos visitantes florais, foram registrados insetos nas flores em 91,67% desse período, em 2004, e 75,0%, em 2005 (Tabela 4).

Em *P. conjugens* foram observadas três espécies de abelhas (Tabela 5), comuns à *P. sessilis* (Tabela 4). *A. palpalis* e *M. bicolor* foram os polinizadores mais importantes em ambos os morfos (Tabela 5). Juntas, essas abelhas, foram responsáveis por 87,32% do total de visitas/inseto (Tabela 5). *M. quadrifasciata* também atuou como polinizador de ambos os morfos, mas com valor percentual baixo, ou seja, com 5,02% do total de visitas/inseto (Tabela 5). A frequência de visitação das moscas, somada à dos besouros, foram pouco representativas (5,69%) em relação à das abelhas (92,34%). As flores longistilas foram nove vezes mais visitadas que as brevistilas (Tabela 5). Das 12 horas de observação, para a contagem dos visitantes florais, foram registrados insetos nas flores em 66,7% desse período.

Em *P. hastisepala* foram observadas quatro espécies de abelhas (Tabela 6), *A. palpalis* e *M. mondury* comuns à *P. sessilis* (Tabela 4) e *A. palpalis* comum a *P. conjugens* (Tabela 5). Todas as abelhas foram observadas em apenas um dos anos de estudo; em 2005, *T. mirabilis* e *A. palpalis* foram os polinizadores mais importantes em ambos os morfos, totalizando juntas 74,55% do total de visitas/inseto (Tabela 6); em 2006, *M. mondury* e *Augochlora* sp. foram os polinizadores mais importantes em ambos os morfos, mas juntas realizaram apenas 32,39% do total de visitas/inseto (Tabela 6). Uma espécie de borboleta foi observada em 2005 e uma de mosca em 2006, perfazendo, cada uma, 25,90 e 47,89% do total de visitas/inseto, respectivamente (Tabela 6). Esses insetos coletavam néctar, entretanto, devido ao pequeno tamanho do corpo ou ao comportamento de visita, não atuavam como polinizadores, assim como os besouros, observados nos dois anos (Tabela 6). Esses últimos insetos cortavam os estigmas das flores longistilas. O número total de visitas/morfo foi semelhante, nos dois anos, apesar das flores longistilas terem recebido um maior número de visitas

(Tabela 6). Das 16 horas de observação/ano, para a contagem dos visitantes florais, foram registrados insetos nas flores em 56,25% desse período, em 2005, e 37,50%, em 2006.

## Discussão

A floração, das espécies estudadas, restrita a alguns meses do ano (floração anual *sensu* Newstrom et al., 1994) e durante a estação chuvosa é similar ao registrado em outras espécies de *Psychotria*, em Floresta Atlântica (Almeida e Alves, 2000; Morellato et al., 2000; Ramos e Santos, 2005; Rossi et al., 2005, Pereira et al., 2006b). Nas espécies citadas anteriormente, apesar dos dados indicarem que maiores pluviosidades e temperaturas podem ser importantes fatores reguladores dessa fenofase, a indução à floração pode ter sido desencadeada em período anterior à estação chuvosa, resultante, por exemplo, de um estresse hídrico, tal como verificado em espécies de *Coffea* por Alvim (1960). Por isso, estudos fisiológicos, além dos ecológicos, são necessários para esclarecer essa questão.

A sincronia de floração entre os morfos florais, das espécies estudadas, no presente trabalho indicam que podem contribuir igualmente para o seu sucesso reprodutivo, favorecido pelas polinizações legítimas. Entretanto, o sucesso também deve estar relacionado à fenologia de floração e à frequência de visitação dos polinizadores, em cada morfo, e as quantificações realizadas no presente estudo demonstraram que esses fatores tendem a variar por episódio reprodutivo. Somam-se ainda outros fatores, que devem agir em sinergia, tais como, a distribuição espacial e a razão dos morfos florais na população (Casper, 1992) e o comportamento dos polinizadores (Ramos e Santos, 2006). Verifica-se, pelo exposto, que o sistema reprodutivo das espécies distílicas é complexo e deve ser analisado em longo prazo, incluindo os efeitos da fragmentação florestal, especialmente a perda da variabilidade genética em populações remanescentes (veja capítulo 3), outro fator determinante para o sucesso reprodutivo dessas plantas.

Dois pulsos de floração por episódio reprodutivo, tal como registrados, principalmente, em *P. sessilis*, foram também registrados em *P. mapouriodes* (Castro e Oliveira, 2002) e em *P. tenuinervis* (Ramos e Santos, 2005). Proença e Gibbs (1994) denominaram essa floração de “pulsada” (“pulsed-bang”), registrada em *Myrcia rhodosepala* (Myrtaceae) e caracterizada por uma floração descontínua, intercalada por um intervalo de dias nos quais não existem flores abertas, tal como

verificado em *P. sessilis*. Esse padrão de floração, em espécies distílicas, pode ser uma estratégia reprodutiva importante para a manutenção da isopleia, favorecendo um dos morfos por pulso, visto que há uma tendência de um dos morfos produzirem mais flores em cada pulso.

A floração das espécies estudadas foi seqüencial, confirmando as observações de Pereira et al. (2006b). *Psychotria nuda* e *P. brasilensis* (Almeida e Alves, 2000) e *P. birotula*, *P. mapouriodes* e *P. pubigera* (Castro e Oliveira, 2002) também apresentaram floração seqüencial. Esse tipo de floração é considerado uma estratégia na qual há a formação e retenção de uma “imagem de procura” alimentar por parte de polinizadores em comum (Thomson, 1980), minimizando a competição por eles entre as espécies. As florações das espécies, em conjunto, parecem promover a “série de reposição” (*sensu* Macior 1971) e os recursos florais ficam disponíveis aos polinizadores por um longo período do ano. A “série de reposição” ocorreu com as espécies estudadas, confirmando a suposição de Pereira et al. (2006b), pois a abelha nativa *Ariphanarthra palpalis* foi comum a todas elas, além de espécies de *Melipona*.

*A. palpalis* é solitária, restrita ao interior de mata, encontra-se em atividade nas primeiras horas da manhã e em dias nublados e é considerada relativamente rara em coleções entomológicas; suas plantas hospedeiras são desconhecidas (G. A. Melo, com. pess.). Portanto, o uso dos recursos florais de espécies de *Psychotria* por machos e fêmeas destas abelhas é dado inédito. Essa abelha representa um importante material de estudo, devido às poucas informações disponíveis sobre ela, à uma característica morfológica que lhe é peculiar, sua língua longa, possibilitando sua visitação em flores tubulosas, e à sua atividade em sincronia com a floração de espécies de *Psychotria*. Sabe-se que outras sete espécies de *Psychotria* ocorrem no sub-bosque da área do presente estudo e também floresceram na estação chuvosa (Pereira et al., 2006a; b). Estariam essas abelhas dependentes dos recursos florais de espécies de *Psychotria*, caracterizando-as como oligoléticas?

As espécies de *Melipona*, por outro lado, são sociais e, em levantamento da fauna de abelhas silvestres da região de Viçosa, foram consideradas espécies típicas das florestas da Zona da Mata mineira, assim como *Trichoceraphis mirabilis* (Cure et al. 1992). Abelhas sociais são generalistas e, por isso, buscam recursos florais em várias plantas de diferentes famílias (Westerkamp, 1991). A ocorrência das espécies de *Psychotria* estudadas no sub-bosque, portanto, também favorece a visitação dessas abelhas.

A composição e a abundância de espécies de polinizadores podem variar anualmente, tal como verificado no presente estudo, e entre populações (Herrera,

1988; Fishbein e Venable, 1996; Vieira e Shepherd, 2002). Considerando essa tendência, as três espécies de *Melipona*, potencialmente, poderiam visitar as flores de todas as espécies de *Psychotria* estudadas, se fossem envolvidos mais eventos reprodutivos. A atratividade às flores é dependente dos números de inflorescências produzidas e de flores abertas/dia e da disponibilidade de recursos florais e parece ser um dos fatores que deve determinar a diversidade de polinizadores (cf. Herrera, 1991; Donaldson et al., 2002). De fato, os maiores números de visitas/ano, às flores das espécies estudadas, corresponderam aos maiores números de flores abertas/dia e, conseqüentemente, à maior disponibilidade de recursos; *P. sessilis* recebeu o maior número de visitas, seguida por *P. conjugens* e, por último, por *P. hastisepala*.

A maior freqüência de visitação às flores longistilas, em todas as espécies estudadas, mas principalmente em *P. conjugens*, também foi registrado em outras espécies de *Psychotria* (Castro e Oliveira, 2002). A preferência, pelos polinizadores, por um morfo floral pode acarretar em um fluxo de pólen assimétrico e unidirecional (Barret, 1992). Sabe-se que o sucesso reprodutivo de espécies distílicas, incluindo as do presente estudo (Pereira et al., 2006b), depende de fluxo gênico entre os morfos florais, realizados pelos polinizadores, pois, comumente, apresentam incompatibilidade após polinizações ilegítimas (Castro et al., 2004; Coelho e Barbosa, 2004; Teixeira e Machado, 2004). Uma das conseqüências dessa preferência é a deposição de pólen incompatível, causando a oclusão do estigma, de tal modo que os grãos compatíveis ficam impossibilitados de germinarem (Ganders, 1979), afetando a frutificação do morfo em questão. A oclusão do estigma, entretanto, deve ser analisada com cautela, uma vez que, dentre as espécies estudadas, apenas as flores longistilas de *P. hastisepala* apresentaram uma porcentagem de frutificação significativamente menor que a das brevistilas (veja capítulo 2). Estudos adicionais, incluindo a contagem e identificação de grãos de pólen depositados nos estigmas, de ambos os morfos, tal como realizado por Shore e Barret (1984) e Barret e Glover (1985), poderão trazer mais subsídios para o melhor entendimento desse intrigante sistema reprodutivo, que é a distília.

A frutificação das espécies estudadas, diferentemente da floração, foi sincrônica e parece ser uma estratégia que deve auxiliar no processo de dispersão, aumentando a atratividade e a disponibilidade de frutos aos pássaros dispersores. Essa estratégia é importante, pois espécies de *Psychotria*, geralmente, apresentam baixo número de frutos maduros por planta (Poulin et al., 1999; Almeida et al., 2006; obs. pes.). Dentre as 21 espécies estudadas por Poulin et al. (1999), no

Panamá, 19 apresentaram padrão de frutificação agregada e o período coincidiu com a temporada de maior abundância de aves dispersoras migratórias. Estudos posteriores, na EPTEAMP, poderão trazer informações sobre a abundância de aves frugívoras durante a frutificação de espécies de *Psychotria*, incluindo as estudadas e mais cinco outras espécies que frutificam no mesmo período do ano (veja Pereira et al., 2006a).

## **Conclusões**

1. A floração de *Psychotria sessilis*, *P. conjugens* e *P. hastisepala* é anual, durante a estação chuvosa, e seqüencial, iniciada por *P. sessilis*, seguida por *P. conjugens* e, por último, *P. hastisepala*.
2. Há sincronia de floração dos morfos das três espécies.
3. Abelhas são os polinizadores das espécies estudadas; a abelha nativa *Ariphanarthra palpalis* é comum a todas elas, além de espécies de *Melipona*.
4. Os morfos, de cada espécie, são polinizados pelas mesmas abelhas.
5. Nas espécies, há tendência do morfo longistilo ser mais visitado que o brevistilo.
6. Nas espécies, há variações anuais na composição e na abundância de espécies de polinizadores.
7. *P. sessilis* apresenta a maior frequência de visitação de polinizadores, provavelmente devido à sua floração mais abundante em relação às demais espécies. É seguida por *P. conjugens* e, por último, *P. hastisepala*.
8. A frutificação das espécies é sincrônica, que deve ser uma estratégia para auxiliar no processo de dispersão dos diásporos por pássaros.

## Referências

- Almeida, E.M.; Alves, M.A. 2000. Fenologia de *Psychotria nuda* e *P. brasilensis* (Rubiaceae) em uma área de Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. **Acta Botânica Brasileira** 14:335-346.
- Almeida, E.M.; Costa, P.F.; Buckeridge, M.S.; Alves, M.A.S. 2006. Potential bird dispersers of *Psychotria* in area of Atlantic Forest on Ilha Grande, RJ, Southeastern Brazil: A biochemical analysis of the fruits. **Brazilian Journal of Biology** 66:1-8.
- Alvim, P.T. 1960. Moisture stress as a requirement for flowering of coffee. **Science** 132:354.
- Andersson, L.A. 1992. A provisional checklist of Neotropical Rubiaceae. **Scripta Botanica Belgica** 1: 1-119.
- Barret, S.C.H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model system for evolutionary analysis. In: Barrett S. C. H (ed.). **Evolution and function of heterostyly**. Springer, Wien New York, pp. 1-24.
- Barret, S.C.H.; Glover, D.E. 1985. On the Darwinian hypothesis of the adaptive significance of tristily. **Evolution** 39: 766-774.
- Burger, W.; Taylor, C.M. 1993. Rubiaceae: Flora Costaricensis. **Field Museum of Natural History** 33:1-333.
- Castro, C.C.; Araújo, A.C. 2004. Distyly and sequential pollinators of *Psychotria nuda* (Rubiaceae) in the Atlantic rain forest, Brazil. **Plant Systematics and Evolution** 244:131-139.
- Castro, C.C.; Oliveira, P.E. 2002. Pollination biology of distylous Rubiaceae in the Atlântica Rain Forest, SE Brazil. **Plant Biology** 4:640-646.
- Castro, C.C.; Oliveira, P.E.A.M.; Alves, M.C. 2004. Breeding system and floral morphometry of distylous *Psychotria* L. species in the Atlantic rain forest, SE Brazil. **Plant Biology** 6: 755-760.
- Cane, J.H. 2001. Habitat fragmentation and native bees: a premature verdict?. **Conservation Ecology** 5:1 [on line] URL: [http:// www.consecol.org/vol5/iss1/art3](http://www.consecol.org/vol5/iss1/art3)
- Casper, BB. 1992. The application of sex allocation theory to heterostylous plants. In: Barrett S. C. H (ed.). **Evolution and function of heterostyly**. Springer, Wien New York, pp. 209-223
- Coelho, C. P.; Barbosa, A.A.A. 2004. Biologia reprodutiva de *Psychotria poeppigiana* Mull. Arg. (Rubiaceae) em mata de galeria. **Acta Botânica Brasileira** 18:481-489.
- Cure, J.R.; Thiengo, M.; Silveira, F.A.; Rocha, L.B. 1992. Levantamento da fauna da abelhas silvestres na "Zona da Mata" de Minas Gerais.III. Mata secundária na região de Viçosa (Hymenoptera, Apoidea). **Revista Brasileira de Zoologia** 9:223-239.
- Donaldson, J.; Nanni, I.; Costas, Z.; Kemper, J. 2002. Effects of habitat fragmentation on pollinator diversity and plant reproductive success in renosterveld shrublands of South Africa. **Conservation Biology** 16:1267-1276.
- Fishbein, M.; Venable, D.L. 1996. Diversity and temporal change in the affective pollinators fo *Asclepias tuberosa*. **Ecology** 77:1061-1073.
- Gentry, A.H. & Emmons, L.H. 1987. Geographical variation in fertility, phenology and composition of the understory of Neotropical forests. **Biotropica** 19:216-227.
- Grandisoli, E.A.C. 1997. **Biologia reprodutiva e estrutura da população de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) em um fragmento de mata secundaria em São Paulo (SP)**. São Paulo-USP (Dissertação de mestrado)
- Herrera, C.M. 1988. Variation in mutualisms: the spatio-temporal mosaic of a pollinator assemblage. **Biological Journal of Linnean Society** 35:95-125.

- Herrera, C.M.1991. Dissecting factors responsible for individual variation in plant fecundity. **Ecology** 72:1436-1448.
- Herrera, C.M. 1995. Microclimate and individual variation in pollinators: Flowering plants are more than their flowers. **Ecology** 76:1516-1524.
- Kearns, C.A.; Inouye, D.W. 1997. Pollinators, Flowering plants, and conservation biology. **BioScience** 47:297-307.
- Koptur, S.; Haber, W.A.; Frankie, G.W.; Baker, H.G. 1988. Phenological studies of shrub and treelet species in tropical cloud forest, Costa Rica. *Journal of Tropical Ecology* 4:323-346.
- Macior, L.W. 1971. Coevolution of plants and animals-systematic insights from plant-insect interactions. **Taxon** 20:17-28.
- Marangon, L. C. 1999. **Florística e fitossociologia de área de floresta estacional semidecidual visando dinâmica de espécies florestais arbóreas no município de Viçosa – MG**. São Carlos-UFSCAR ( Tese de Doutorado)
- Martin-Gajardo, I.; Morellato, L.P.C. 2003. Fenologia de Rubiaceae do Sub-bosque em floresta Atlântica no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 26:299-309.
- Morellato, L.P.C.; Talora, d.C.; Takahasi, A.; Bencke, C.C. Romera, E.c.; Zipparro, V.B. 2000. Phenology of Atlantic rain forest trees: a comparative study. **Biotropica** 32: 811-823.
- Newstrom, L.E.; Frankie, G.W.; & Baker, H.G. 1994. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rains forest trees, at La Selva, Costa Rica. **Biotropica** 26: 141-159.
- Pereira, Z.V.; Carvalho-Okano, R.M.; Garcia, F.C.P. 2006a. Rubiaceae Juss. da Reserva Florestal Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasileira** 20:207-224.
- Pereira, Z.V.; Vieira, M.F.; Carvalho-Okano, R.M. 2006b. Fenologia de floração, morfologia floral e sistema de incompatibilidade em espécies distílicas de Rubiaceae em fragmento florestal do sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica** 29:471-480.
- Pijl, L. van der. 1982. **Principles of dispersal in higher plants**. New York: Springer-Verlag.
- Poulin, B.; Wrigt, S.; Lefebvre, G.; Calderon, O. 1999. Interspecific synchrony and asynchrony in the phenologies of congeneric bird-dispersed plants in Panama. **Journal Tropical Ecology** 15:213-217.
- Proença, C.E.B.; Gibbs P.E. 1994. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from central Brazil. **New Phytologist** 126:343-354.
- Ramos, F.N.; Santos, F.A.M. 2005. Phenology of *Psychotria tenuinervis* (Rubiaceae) in Atlantic Forest fragments: fragment and habitat scales. **Canadian Journal of Botany** 83:1305-1316.
- Ramos, F.N.; Santos, F.A.M. 2006. Floral visitors and pollination of *Psychotria tenuinervis* (Rubiaceae): Distance from the anthropogenic and natural edges of Atlantic Forest Fragment. **Biotropica** 38:383-389.
- Richards, A.J. 1997. **Plant breeding systems**. London: Chapman & Hall.
- Rizzini, C.T. 1992. **Tratado de fitogeografia do Brasil**: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos. São Paulo: Âmbito Cultural.
- Rossi, A.A.B.; Oliveira, L.O.; Vieira, M.F. 2005. Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stckes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 28:285-294.
- Sazima, I.; Buzato, S.; Sazima, M. 1996. An assemblage of hummingbird-pollinated flower in a montane forest in southeastern Brazil. **Botanical Acta**. 109:146-160.
- Shore, J.S.; Barret, S.C.H. 1984. The effect of pollination intensity and incompatible pollen on seed set in *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Canadian Journal of Botany* 62:1298-1303

- Taylor, C.M. 1997. Conspectus of the genus *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotrieae) with the description of some new species from Ecuador and Colombia. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 84:224-262.
- Teixeira, L.A.G.; Machado, I.C. 2004. Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). **Acta Botânica Brasileira** 18:853-862.
- Thomson, J.D. 1980. Skewed flowering distributions and pollinator attraction. **Ecology** 61:72-579.
- van Schaik, C.P.; Terborgh, J.W.; Wright, S.J. 1993. The phenology of tropical forests: adaptative significance and consequences for primary consumers. **Annual Review of Ecology and Systematic** 24:353-377.
- Veloso, H.P.; Rangel-Filho, A.L.R.; Lima, J.C.A. 1991. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE.
- Vieira, M.F.; Shepherd, G.J. 2002. Removal and insertion of pollinia in flowers of *Oxypetalum* (Asclepiadaceae) in southeastern Brazil. **Revista de Biología Tropical** 50:37-43.
- WesterKamp, C. 1991. Honeybees are poor pollinators – Why? **Plant Systematics and Evolution** 177:71-75.
- Zar, J.H. 1999. **Bioestatistical analysis**. New Jersey: Princt-Hall.

## CAPÍTULO 2

**Sucesso reprodutivo de três espécies distílicas de *Psychotria* (Rubiaceae) em fragmento florestal do sudeste brasileiro**

## Resumo

Foram objetivos conhecer o sucesso reprodutivo e adicionar dados a respeito da biologia reprodutiva de *Psychotria conjugens* Müll. Arg., *P. hastisepala* Müll. Arg. e *P. sessilis* Vell., espécies distílicas e coocorrentes em sub-bosque de fragmento florestal no município de Viçosa, Zona da Mata de Minas Gerais. Para tanto, buscou-se analisar as seguintes questões: A proporção de indivíduos entre os morfos florais de cada espécie, em uma área de sete hectares; A frutificação após polinizações manuais *in vivo*; As diferenças de tamanho e viabilidade dos grãos de pólen dos morfos florais de cada espécie; A frutificação e a produção de sementes por morfo em cada espécie. Os trabalhos de campo foram realizados na Estação de Pesquisa Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso, maior fragmento do município. As espécies apresentaram razões equilibradas entre morfos brevistilo (B) e longistilo (L), ou seja, há isopleτία; entretanto foram amostrados, no mínimo, cerca de 3,4 vezes mais indivíduos de *P. sessilis* que as demais espécies (180 contra 33 de *P. conjugens* e 54 de *P. hastisepala*). Os resultados das polinizações manuais *in vivo* demonstraram incompatibilidade intramorfos. A viabilidade dos grãos de pólen foi >64%, em ambos os morfos das três espécies, e não houve diferença significativa na viabilidade entre morfos de cada espécie. O diâmetro dos grãos de pólen das flores brevistilas foi significativamente maior, em todas as espécies. A frutificação natural foi alta ( $\geq 53\%$ ) em ambos os morfos de *P. sessilis* e no morfo brevistilo de *P. hastisepala*. Em *P. conjugens* e no morfo longistilo de *P. hastisepala* a frutificação natural foi baixa ( $\leq 29\%$ ). Não houve diferença significativa no número de frutos e sementes entre os morfos em *P. sessilis* e *P. conjugens*. As flores brevistilas de *P. hastisepala* produziram um número de frutos e de sementes significativamente maior que as longistilas. Das espécies estudadas, o maior sucesso reprodutivo foi registrado em *P. sessilis*, favorecido pelas altas frutificações naturais, viabilidades dos grãos de pólen e produções de frutos (717L e 569B) e sementes (1.248L e 981B), em ambos morfos, além da isopleτία. *P. conjugens* apresentou uma das menores quantidades totais de sementes (316L e 340B) e porcentagens de frutos com duas sementes. Seu baixo sucesso reprodutivo parece estar relacionado à limitação de pólen, apesar da isopleτία. *P. hastisepala* foi a única espécie que apresentou diferenças no sucesso reprodutivo entre os morfos. O longistilo apresentou a mais baixa frutificação natural (20%) e o menor número de frutos (121, contra 229 de B) e de sementes (229, contra 444) registrados. Provavelmente, a oclusão do estigma das flores longistilas, com pólen incompatível, e os danos causados por herbívoros ao seu estigma, exposto fora do tubo floral, podem ser fatores relacionados ao seu baixo sucesso reprodutivo.

## Sucesso reprodutivo de três espécies distílicas de *Psychotria* (Rubiaceae) em fragmento florestal do sudeste brasileiro

### Introdução

*Psychotria* é um dos gêneros de Rubiaceae que possui o maior número de espécies distílicas (Almeida & Alves, 2000), que são encontradas, comumente, em sub-bosques de florestas tropicais (Hamilton, 1990; Taylor, 1996).

A distília é um dimorfismo floral controlado geneticamente e normalmente identificado por duas características principais: posicionamento recíproco de estigmas e anteras entre dois morfos florais, brevistilo (B) e longistilo (L), produzidos em indivíduos distintos, e presença de um sistema de incompatibilidade após polinizações ilegítimas (auto e intramorfos). Nas espécies distílicas, a frutificação, geralmente, é dependente de polinizações legítimas (intermorfos), realizadas pelos polinizadores (Barrett, 1992).

O sucesso reprodutivo (*sensu* Contreras & Ornelas, 1999) de espécies distílicas é dependente de vários fatores associados, como, por exemplo, outros dimorfismos florais, além dos citados anteriormente (Vuilleumier, 1967; Ganders, 1979; Sobrevilla et al., 1983; Dulberger, 1992; Ree, 1997; Dulberger & Ornduff, 2000; Faivre & McDade, 2001; Ornelas et al., 2004a; Ornelas et al., 2004b; Teixeira & Machado, 2004a; Pereira et al., 2006), a proporção equilibrada entre os morfos (isopleτία), na população (Sobrevilla et al., 1983; Pailler & Thompson, 1997), a distribuição espacial dos morfos, na população (Wesselingh et al., 1999) e o comportamento dos polinizadores (Linhart, 1973; Murcia & Feinsinger 1996). Somase a esses fatores, a fenologia de floração e a frequência de visitaçã dos polinizadores, em cada morfo (capítulo 1).

Em algumas situações, o dimorfismo interfere no fluxo de pólen entre os morfos e acarreta conflito reprodutivo entre eles e, como consequência, um tende a exercer a função feminina e o outro, a masculina; nesse caso, há desvio da proporção equilibrada (anisopleτία) entre morfos (Richards, 1997; Contreras & Ornelas, 1999). Esse desvio também foi registrado em espécies distílicas autocompatíveis (Ganders, 1979) e com propagação vegetativa (Sobrevilla et al., 1983; Rossi et al., 2005), nas quais registrou-se baixa frutificação ( $\leq 25\%$ ; Rossi et al., 2005).

As espécies estudadas, *Psychotria conjugens* Müll. Arg., *P. hastisepala* Müll. Arg. e *P. sessilis* Vell., são distílicas, isopléticas, exceto *P. conjugens*, e apresentam vários dimorfismos florais; esses dados foram obtidos por Pereira et al.

(2006), no mesmo local do presente estudo e em uma área de cerca de um hectare. Essas autoras verificaram que essas espécies são auto-incompatíveis, após polinizações manuais *in vitro*. Seu sucesso reprodutivo, entretanto, é desconhecido, assim como a ocorrência de dimorfismo em seus grãos de pólen. Com o objetivo de conhecer o sucesso reprodutivo dessas plantas, buscaram-se dados adicionais sobre a sua biologia reprodutiva, tais como: 1) A proporção de indivíduos entre os morfos florais de cada espécie, em uma área de sete hectares; 2) A frutificação após polinizações manuais *in vivo*; 3) As diferenças de tamanho e viabilidade dos grãos de pólen dos morfos florais de cada espécie; 4) A frutificação e a produção de sementes por morfo em cada espécie.

## **Material e métodos**

**Área de estudo e espécies estudadas** - O estudo foi desenvolvido na Estação de Pesquisa Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso (EPTEAMP), fragmento florestal do município de Viçosa (20°45'S e 42°51'W), Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, com cerca de 650m de altitude. O clima de Viçosa é caracterizado por apresentar temperatura média anual de 19°C, precipitação anual de 1300 a 1400mm, com o período de maior precipitação ocorrendo entre os meses de outubro a março (Fig. 1), e umidade relativa do ar de 80 a 85%. Durante o período de estudo (set/2004 a abril/2005 e set/2005 a abril/2006) observou-se que a maior média mensal de precipitação ( $\bar{X} = 5,22\text{mm}$ ) concentrou-se nos meses de dezembro a março, período em que também foram observadas as temperaturas mais elevadas ( $\bar{X} = 21,44^\circ\text{C}$ ). Os dados climatológicos foram fornecidos pela Estação Meteorológica da Universidade Federal de Viçosa.

A vegetação original de Viçosa está inserida nos domínios da Floresta Atlântica (Rizzini, 1992) e foi classificada, por Veloso et al. (1991), como Floresta Estacional Semidecidual Submontana. A EPTEAMP é uma área de preservação ambiental, de regeneração secundária, com cerca de 168 ha e está vinculada ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa.

*P. conjugens* e *P. hastisepala* são subarbustos de 1,0 a 2,5 m, ambas com distribuição restrita ao território nacional, ocorrendo do sul do Pará até o Rio Grande do Sul (Andersson, 1992). *P. sessilis* é arbusto de 1,5 a 3,5 m de altura e, além do Brasil, ocorre em vários outros países sul-americanos (Andersson, 1992). Todas habitam o sub-bosque e suas flores apresentam antese diurna, corola tubulosa, de cor branca ou creme e têm duração de um dia (Pereira et al., 2006).

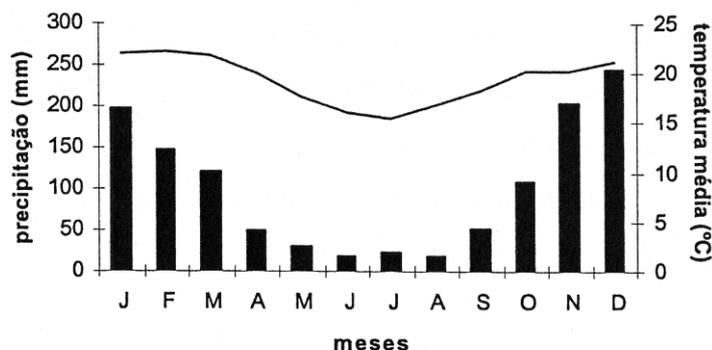


Figura 1. Precipitação e temperatura média, ao longo do ano em Viçosa, Minas Gerais (média de 1961 a 1990). Fonte: Marangon (1999)

Os frutos são drupáceos e ornitocóricos (*sensu* Pijl, 1982). Cada fruto produz de uma a duas sementes (obs. pes.). Espécimes-testemunho encontram-se depositados no Herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa (nos. 26.963, 26.964 e 26.974).

**Proporção entre os morfos florais** - Em uma área de sete hectares, foi feita a contagem e identificados os morfos de todos os indivíduos floridos, de cada espécie. A distância mínima mantida entre indivíduos foi de 3 m. Desse modo, tentou-se evitar a inclusão, na contagem, de clones, produzidos pelas espécies com reprodução vegetativa (*P. hastisepala*, obs. pess.).

**Polinizações manuais *in vivo*** - Os tratamentos foram realizados em dois episódios reprodutivos consecutivos, exceto para *P. conjugens*. Nesta espécie, as polinizações manuais foram realizadas somente na floração de 2005/2006. Utilizou-se a metodologia de Bawa & Beach (1983): BxB e LxL (autopolinização e polinização intramorfo) e BxL e LxB (polinizações intermorfos). Em todas as espécies, inflorescências jovens foram isoladas com sacos de tecido do tipo organza e as flores polinizadas tiveram seus pedicelos marcados com linhas coloridas (cada cor correspondendo a um tipo de polinização). As polinizações manuais foram realizadas no período da manhã (7:00 às 9:00h). Algumas inflorescências tiveram seus pedicelos marcados como controle, para avaliar a eficiência da polinização natural. Após os tratamentos, as inflorescências permaneceram ensacadas até a frutificação ou a queda da flor.

**Tamanho e viabilidade dos grãos de pólen** - Para as medições, foram coletados cinco botões, em pré-antese, de cinco indivíduos de cada morfo. Esses botões

foram estocados em Ácido Acético. As anteras, de cada botão floral, foram maceradas em lâmina e coradas com Carmim Acético (Radford et al., 1974). Em cada lâmina foram medidos oito grãos, totalizando 200 grãos por morfo. Devido ao seu formato circular, em cada grão foram realizadas seis medidas (diâmetros) e tirada a média. Imagens dos grãos de pólen foram capturadas em microscópio (OLYMPUS AX 70) e as medidas ( $\mu\text{m}$ ) foram obtidas usando o software Imagem-pro plus.

Para a determinação da viabilidade dos grãos de pólen, foram coletados outros cinco botões, em pré-antese, de cinco indivíduos diferentes, totalizando 25 botões por morfo floral por espécie. Esses botões foram estocados em etanol 70%. As anteras, de cada botão, foram maceradas em lâmina, sobre uma gota de Carmim Acético (Radford et al., 1974). Em cada lâmina (total de 50) foram contados 200 grãos (Kearns & Inouye, 1993).

**Produção de frutos e sementes** - Em cinco inflorescências de 10 indivíduos de cada morfo de cada espécie estudada, foi feita a contagem do número de frutos/inflorescência, oriundos de polinizações naturais, e de sementes/fruto.

**Análise estatística** - Análises estatísticas foram conduzidas usando o Programa "General Linear Model", no software Statistica versão 5.5 (StatSoft, 2000). Nas Análises de Variância foi aplicado o teste One - way ANOVA (Zar, 1999).

## **Resultados**

**Proporção de morfos** - A proporção de indivíduos foi de 93B:87L em *P. sessilis*, 28B:26L em *P. hastisepala* e 18B:15L em *P. conjugens*. Estas proporções não diferem de 1:1 e, por isso, a razão entre os morfos é equilibrada, ou seja, há isopleτία.

**Sistema reprodutivo** - Os resultados da Tabela 1 corroboraram os de Pereira et al. (2006), ou seja, as espécies de *Psychotria* estudadas apresentaram incompatibilidade após polinizações ilegítimas. Os frutos registrado em *P. conjugens* e *P. hastisepala*, após a autopolinização LxL (Tabela 1), deve ser resultante de uma contaminação acidental. Os resultados dos controles indicaram que os polinizadores têm realizado o fluxo gênico entre os morfos florais de cada espécie estudada (Tabela 1). Entretanto, as frutificações em *P. conjugens* foram baixas, nesse tratamento, se comparadas com as das demais espécies, exceto com

Tabela 1. Resultados das polinizações manuais, *in vivo*, em flores de espécies de *Psychotria*, na Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais. AP = Autopolinização, PI = Polinização intramorfos, PL = Polinização legítima, CO = Controle, B = Brevistila, L = Longistila.

Testes	Morfos	<i>P. sessilis</i>			<i>P. conjugens</i>			<i>P. hastisepala</i>		
		Ind. N°	Flor N°	Fruto N° / %	Ind. N°	Flor N°	Fruto N° / %	Ind. N°	Flor N°	Fruto N° / %
AP	BxB	10	18	0 / 0	5	8	2 / 25	11	16	0 / 0
	LxL	10	22	0 / 0	8	10	1 / 10	13	15	1 / 6
PI	BxB	9	12	0 / 0	6	8	0 / 0	12	15	0 / 0
	LxL	12	15	0 / 0	6	8	0 / 0	10	15	0 / 0
PL	BxL	15	18	13 / 72	6	7	6 / 86	10	13	4 / 31
	LxB	12	15	11 / 73	8	9	6 / 66	9	16	6 / 37
CO	B	8	72	38 / 53	5	35	10 / 29	8	55	32 / 58
	L	9	63	45 / 72	5	38	8 / 21	9	81	16 / 20

o morfo longistilo de *P. hastiepala*, que também apresentou baixa frutificação (Tabela 1).

**Viabilidade e tamanho dos grãos de pólen** - A viabilidade do pólen encontra-se na (Tabela 2), não houve diferença significativa entre os morfos. Os diâmetros dos grãos de pólen das flores brevistilas, em todas as espécies, foram significativamente maiores que os das longistilas (Tabela 2).

**Produção de frutos e sementes** - O número de frutos e de sementes, de cada morfo floral, das espécies estudadas, encontra-se na Tabela 3. Não houve diferença significativa no número de frutos entre os morfos de *P. sessilis* ( $F = 0,32$ ,  $p = 0,56$ ), na porcentagem de frutos com uma semente ( $F = 0,09$ ,  $P = 0,76$ ) e com duas sementes ( $F = 0,43$ ,  $p = 0,51$ ) e no número total de sementes produzidas ( $F = 0,89$ ,  $p = 0,34$ ). *P. conjugens* também não apresentou diferenças significativas nesses mesmos parâmetros (respectivamente,  $F = 0,009$ ,  $p = 0,92$ ;  $F = 2,03$ ,  $p = 0,17$ ;  $F = 0,3$ ,  $p = 0,58$ ;  $F = 0,08$ ,  $p = 0,77$ ). Por outro lado, as flores brevistilas de *P. hastisepala* produziram um número de frutos significativamente maior ( $F = 4,80$ ;  $p = 0,04$ ) que as flores longistilas (Tabela 3), assim como foi maior o número de frutos com duas sementes ( $F = 6,03$ ;  $p = 0,02$ ) e de sementes totais produzidas ( $F = 6,61$ ;  $p = 0,013$ ); não houve diferença significativa, entre morfos, apenas quanto à porcentagem de frutos com uma semente ( $F = 0,02$ ,  $p = 0,88$ ) (Tabela 3).

Tabela 2. Viabilidade e tamanho de grãos de pólen de *Psychotria sessilis*, *P. conjugens* e *P. hastisepala* na Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais.

Espécie/ morfos	Viabilidade de pólen (%)			Diâmetro de pólen		
	$\bar{X}$	DP	F	$\bar{X}$	DP	F
<i>P. sessilis</i>						
B	81,62 ± 14,23		0,49 (NS)	8,40 ± 0,53		797,1**
L	76,16 ± 28,19			7,16 ± 0,31		
<i>P. conjugens</i>						
B	69,34 ± 26,06		2,44 (NS)	8,40 ± 0,36		487,4**
L	64,40 ± 25,54			7,72 ± 0,24		
<i>P. hastisepala</i>						
B	90,82 ± 7,51		0,11 (NS)	9,77 ± 0,32		738,4**
L	90,71 ± 9,29			8,74 ± 0,42		

\*\*P < 0,05 pelo teste One-Way Anova

Tabela 3. Número de frutos, porcentagem de frutos com uma ou duas sementes e total de sementes produzidas, nos morfos florais de espécies de *Psychotria*, na Estação de Pesquisa Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais.

Espécie	Morfo	Frutos (no.)	Frutos (%) com		Total de sementes (no.)
			1 semente	2 sementes	
<i>P. sessilis</i>	B	569	27,60	72,40	981
	L	717	26,10	73,90	1248
<i>P. conjugens</i>	B	196	26,50	73,50	340
	L	203	44,30	55,70	316
<i>P. hastisepala</i>	B	229	6,10	93,90	444
	L	121	10,80	89,20	229

## Discussão

A isoplelia verificada em *P. sessilis* e *P. hastisepala* confirmaram os dados de Pereira et al. (2006). Essas autoras, entretanto, mencionaram que *P. conjugens*, na EPTEAMP, é anisoplética, diferindo dos resultados do presente estudo. Essa diferença deve ser resultante do tamanho da área amostrada; a área é cerca de sete vezes maior que a utilizada por Pereira et al. (2006). A razão equilibrada entre os morfos florais é uma característica desejável em espécies distílicas (Murcia, 1996), pois deste modo podem contribuir igualmente para o seu sucesso reprodutivo, e tem sido registrada em outras espécies distílicas de *Psychotria* (Castro & Araújo, 2004; Coelho & Barbosa, 2004; Rossi et al., 2005).

A alta viabilidade dos grãos de pólen, tal como verificado, é característica comum em espécies heterostílicas (Dulberger, 1992), também registrada em *Psychotria poeppigiana* (Coelho & Barbosa, 2004) e *P. barbiflora* (Teixeira & Machado, 2004a). O maior diâmetro do pólen em flores brevistilas também é resultado esperado em espécies distílicas, inclusive em espécies de *Psychotria* (veja Jung-Mendaçolli & Melhem, 1995). Estas diferenças morfométricas, segundo Ganders (1979), são necessárias para que haja maior armazenamento de reservas nos grãos das flores brevistilas; essa reserva adicional daria condições de crescimento dos seus tubos polínicos nos longos estiletos das flores longistilas.

Dentre as espécies estudadas, o maior sucesso reprodutivo foi registrado em *P. sessilis*, favorecido pelas altas frutificações naturais, viabilidades dos grãos de pólen e produções de frutos e sementes, em ambos morfos, além da isoplelia. É amplamente visitada pelos polinizadores e sua floração é abundante (capítulo 1). Na área de estudo, apesar da vegetação alterada, essa espécie parece estar amplamente distribuída; foram amostrados, no mínimo, cerca de 3,4 vezes mais indivíduos de *P. sessilis* que as demais espécies (180 contra 33 de *P. conjugens* e 54 de *P. hastisepala*). Todas essas características parecem agir em sinergia garantindo o seu sucesso reprodutivo. Em espécies nas quais a polinização cruzada é obrigatória e realizada por insetos, tal com em *P. sessilis*, o tamanho da população está diretamente relacionado com a atração de polinizadores e tem influência positiva no seu sucesso reprodutivo (Sih & Baltus, 1987; Aguilar & Galetto, 2004).

*P. conjugens* apresentou frutificações naturais, viabilidades dos grãos de pólen e produções de frutos e sementes menores que as obtidas em *P. sessilis*, assim como foram menores as intensidades de sua floração e de visitação (capítulo 1). Essa espécie foi a que apresentou o menor número de indivíduos amostrados,

embora esteja em isoplelia. Segundo Sih & Baltus (1987), pequenas populações têm a sua atratividade reduzida e o seu sucesso reprodutivo é afetado. De fato, dentre as espécies estudadas, *P. conjugens* foi a que apresentou a menor quantidade total de sementes, exceto em relação ao morfo longistilo de *P. hastisepala*, e as menores porcentagens de frutos com duas sementes, o que indica limitação de pólen, semelhante ao registrado em outras espécies auto-incompatíveis e com populações reduzidas (Jennersten, 1988; Agren, 1996). A quantidade de pólen tem sido um fator inibidor no sucesso reprodutivo de espécies auto-incompatíveis (Tomimatsu & Ohara, 2002). Verifica-se, portanto, que a razão equilibrada entre os morfos de *P. conjugens*, por si, não garantiu frutificações abundantes e demonstra que a isoplelia não deve ser vista como um fator isolado, que garanta o sucesso reprodutivo de espécies distílicas, na população.

As flores longistilas de *P. conjugens* apresentaram a tendência de serem mais visitadas que as brevistilas (nove vezes mais, capítulo 1) e, apesar disso, produziram menor quantidade total de sementes e maior porcentagem de frutos com uma semente. Esses resultados indicam que, nessas flores, a exposição do estigma, fora do tubo da corola, pode ter favorecido a deposição de pólen incompatível, uma vez que os polinizadores tendem a visitar seqüencialmente todas as flores do mesmo indivíduo (geitonogamia *sensu* Richards, 1997, capítulo 1). Esse comportamento poderia causar a oclusão do estigma e estilete com grãos de pólen incompatíveis e impossibilitaria ou diminuiria as chances de germinação de grãos de pólen compatíveis, tal como verificado por Ganders (1979) e Dulberger (1992), em outras espécies distílicas.

*P. hastisepala* foi, dentre as espécies estudadas, a que apresentou diferenças entre os morfos, em relação às frutificações naturais e à produção de frutos e sementes. As flores brevistilas produziram duas vezes mais frutos que as longistilas, no controle, e cerca de duas vezes mais sementes. Essa espécie também foi a única, dentre as estudadas, que apresentou reprodução vegetativa (obs. pess.). Esse mecanismo reprodutivo pode alterar à proporção esperada em espécies heterostílicas, privilegiando o morfo que possuir maior capacidade de instalação de novos clones (Grandisioli, 1997). Entretanto, isso não parece ocorrer com *P. hastisepala*, dado a sua isoplelia, na área de estudo. Portanto, outros fatores têm afetado o sucesso reprodutivo das flores longistilas.

*P. hastisepala* foi também, dentre as espécies estudadas, a que apresentou a menor intensidade de floração, número de flores abertas/indivíduo/dia e frequência de visitação (capítulo 1). Os polinizadores, observados por dois anos consecutivos, foram inconstantes, tanto entre os morfos quanto entre os anos estudados (capítulo

1). No entanto, as flores brevistilas não pareceram ter sido afetadas, considerando o seu maior sucesso reprodutivo em relação às longistilas e aos morfos florais de *P. conjugens*.

Sucessos distintos, entre morfos de espécies distílicas, têm sido registrados e as justificativas para essas diferenças envolveram o comportamento de polinizadores (Stone, 1996; Teixeira & Machado, 2004a; b; Castro & Araújo, 2004) e a oclusão do estigma de flores longistilas com pólen incompatível (Teixeira & Machado, 2004b). Entretanto, estudos realizados com *P. barbiflora* demonstraram que o sucesso reprodutivo dos morfos, quando analisados em populações distintas, pode variar. Monteiro et al. (1991) observaram que as flores longistilas de *P. barbiflora* produziram maior número de frutos que as brevistilas, em população de cerrado; Teixeira & Machado (2004a), analisando uma população de Mata Atlântica, observaram maior produção de frutos nas brevistilas. O baixo sucesso das longistilas em *P. hastisepala*, na área do presente estudo, também pode estar relacionado à oclusão do estigma, como verificado por Webb e Lloyd (1986). Além disso, um outro fator que pode ter afetado o sucesso dessas flores foi os danos (herbivoria) causados por coleópteros, freqüentemente registrados na área de estudo, aos estigmas expostos do morfo longistilo. Esses danos, entretanto, não foram quantificados e, estudos posteriores, poderão esclarecer melhor seu significado. A produção de sementes em *P. hastisepala*, em seis outros fragmentos do município de Viçosa, menores que o utilizado no presente estudo, também foi significativamente maior no morfo brevistilo (capítulo 3).

## Conclusões

1. As espécies estudadas, na área de estudo, são isopléticas: a proporção de indivíduos é de 93B:87L em *Psychotria sessilis*, 28B:26L em *P. hastisepala* e 18B:15L em *P. conjugens*.
2. As espécies são auto-incompatíveis e apresentam alta viabilidade dos grãos de pólen; os maiores diâmetros de grãos são das flores brevistilas.
3. A produção de frutos e sementes entre os morfos de *P. sessilis* e de *P. conjugens* é semelhante e os de *P. hastisepala* é desigual; nesse caso é maior no brevistilo.
4. O maior sucesso reprodutivo é de *P. sessilis*, devido à abundante floração, às altas freqüências de visitação, às altas produções de frutos e de sementes, além da viabilidade dos grãos, da isopletria e do grande número de indivíduos amostrados.

5. *P. conjugens* apresenta o menor número de indivíduos, uma das menores quantidades de sementes registradas e, no morfo longistilo, a menor porcentagem de frutos com duas sementes; esses resultados indicam limitação de pólen, apesar da isopleτία.
6. O baixo sucesso reprodutivo do morfo longistilo de *P. hastisepala* pode estar relacionado ao comportamento do polinizador, resultando na oclusão do estigma com pólen incompatível, e aos danos ao seu estigma, exposto fora do tubo floral, provocado por coleópteros.

## Bibliografia

- Agren, J. 1996. Population size, pollinator limitation, and seed set in the self-incompatible herb *Lytrum salicaria*. **Ecology** 77:1799-1990.
- Aguilar, R.; Galetto, L. 2004. Effects of forest fragmentation on male and female reproductive success in *Cestrum parqui* (Solanaceae). **Oecologia** 138:513-520.
- Almeida, E.M.; Alves, M.A. 2000. Fenologia de *Psychotria nuda* e *P. brasiliensis* (Rubiaceae) em uma área de Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. **Acta Botânica Brasileira** 14:335-346.
- Andersson, L.A. 1992. A provisional checklist of Neotropical Rubiaceae. **Scripta Botanica Belgica** 1: 1-119.
- Barret, S.C.H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model system for evolutionary analysis. In: **Evolution and function of heterostyly**. Barrett, S. C. H (ed.). Springer, Wien New York, pp. 1-24.
- Castro, C.C.; Araújo, A.C. 2004. Distyly and sequential pollinators of *Psychotria nuda* (Rubiaceae) in the Atlantic rain forest, Brazil. **Plant Systematics and Evolution** 244:131-139.
- Coelho, C. P.; Barbosa, A.A.A. 2004. Biologia reprodutiva de *Psychotria poeppigiana* Mull. Arg. (Rubiaceae) em mata de galeria. **Acta Botânica Brasileira** 18:481-489.
- Contreras, P.S.; Ornelas, J.F. 1999. Reproductive conflicts of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) a distylous shrub of a Tropical cloud forest in Mexico. **Plant Systematics and Evolution** 219:225-241.
- Dulgerger, R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In: **Evolution and function of heterostyly**. Barrett, S. C. H (ed.). Springer, Wien New York, pp. 40-48.
- Dulberger, R.; Ornduff, R. 2000. Stigma morphology in distylous and non-heterostylous species of *Villarsia* (Menyanthaceae). **Plant Systematics and Evolution** 225:171-184.
- Faivre, A.E.; McDade, L. 2001. Population-level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of anthers and stigmas characterize heterostyly?. **American Journal of Botany** 88:841-853.
- Ganders, F.R. 1979. The biology of heterostyly. **New Zealand Journal of Botany** 17: 607-635.
- Grandisioli, E.A.C. 1997. **Biologia reprodutiva e estrutura da população de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) em um fragmento de mata secundária em São Paulo (SP)**. São Paulo-USP (Dissertação de mestrado)
- Hamilton, C.W. 1990. Variation on a distylous theme in Mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). **Memoirs of the New York Botanical Garden** 55:62-75.
- Jennersten, O. 1988. Pollination in *Dianthus deltoids* (Caryophyllaceae): effects of habitat fragmentation on visitation and seed set. **Conservation Biology** 2: 359-366.
- Jung-Mendaçolli, S.L.; Melhem, T.S. 1995. Grãos de pólen de espécies heterostilicas de Rubiaceae. **Revista Brasileira de Botânica** 18:61-93.
- Kearns, C.A.; Inouye, D.W. 1993. **Techniques for pollination biologists**. Colorado: University Press of Colorado.
- Linhart, Y.B. 1973. Ecological and behavioral determinants of pollen dispersal in hummingbird-pollinated *Heliconia*. **American Naturalist** 107:511-523.
- Marangon, L. C. 1999. **Florística e fitossociologia de área de floresta estacional semidecidual visando dinâmica de espécies florestais arbóreas no município de Viçosa – MG**. São Carlos-UFSCAR ( Tese de Doutorado)

- Monteiro, R.; Nakajima, J.N.; Ribeiro, J.L.S.; Toledo, J.C. 1991. Morfologia e distribuição espacial das formas heterostílicas de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). **Naturalia** 16:137-146.
- Murcia, C. 1996. Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. In: **Forest patches in tropical landscapes**. Schellas, J.; Greenberg, R. (eds.). Washington: Island Press, pp. 19-36.
- Murcia, C.; Feinsinger, P. 1996. Interspecific pollen loss by hummingbirds visiting flower mixtures: Effects of floral architecture. **Ecology** 77:550-560.
- Ornelas, J.F.; Jiménez, L.; González, C.; Hernández, A. 2004a. Reproductive ecology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in a tropical montane cloud forest. I. Hummingbird's effectiveness as pollen vectors. **American Journal of Botany** 91:1052-1060.
- Ornelas, J.F.; González, C.; Jiménez, L.; Lara, C.; Martínez, A.J. 2004b. Reproductive biology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in a tropical montane cloud forest. II Attracting and rewarding mutualistic and antagonistic visitors. **American Journal of Botany** 91:1061-1069.
- Paillet, T.; Thompson, J.D. 1997. Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (Rubiaceae) endemic to La Reunion Island. **American Journal of Botany** 84:315-327.
- Pereira, Z.V.; Vieira, M.F.; Carvalho-Okano, R.M. 2006. Fenologia de floração, morfologia floral e sistema de incompatibilidade em espécies distílicas de Rubiaceae em fragmento florestal do sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica** 29:471-480.
- Pijl, L. van der. 1982. **Principles of dispersal in higher plants**. New York: Springer-Verlag.
- Radford, A.E.; Dickson, W.C.; Massey, J.R.; Bell, C.R. 1974. **Vascular plant systematics**. New York: Harper & Row.
- Ree, R. 1997. Pollen flow, fecundity, and the adaptive significance of heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). **Biotropica** 29:298-308.
- Richards, A.J. 1997. **Plant breeding systems**. London: Chapman & Hall.
- Rizzini, C.T. 1992. **Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. São Paulo: Âmbito Cultural.
- Rossi, A.A.B.; Oliveira, L.O.; Vieira, M.F. 2005. Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stckes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 28:285-294.
- Sih, A.; Baltus, M.S. 1987. Patch size, pollinator behavior, and pollination limitation in catnip. **Ecology** 68:1679-1690.
- Sobrevilla, C. 1983. Reproductive biology of *Palicourea fendleri* e *P. petiolaris* (Rubiaceae), heterostylous shrubs of a tropical cloud. **Biotropica** 15:161-169.
- Stone, J.L. 1996. Components of pollination effectiveness in *Psychotria suerrensii*, a tropical distylous shrub. **Oecologia** 107:505-512.
- Taylor, C.M. 1997. Conspectus of the genus *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotrieae) with the description of some new species from Ecuador and Colombia. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 84:224-262.
- Teixeira, L.A.G.; Machado, I.C. 2004a. Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). **Acta Botânica Brasileira** 18:853-862.
- Teixeira, L.A.G.; Machado, I.C. 2004b. *Sabicea cinera* Aubl. (Rubiaceae): distília e polinização em um fragmento de Floresta Atlântica em Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 27:193-204.
- Veloso, H.P.; Rangel-Filho, A.L.R.; Lima, J.C.A. 1991. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE.
- Tomimatsu, H.; Ohara, M. 2002. Effects of forest fragmentation on seed production of the understory herb *Trillium camschatcense*. **Conservation Biology** 16:1277-1285.

- Vuilleumier, B.S. 1967. The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. **Evolution** 21:210-226.
- Webb, C.J.; Lloyd, D.G. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. II. Herkogamy. **New Zealand Journal of Botany** 24:163-178.
- Wesselingh, R.A.; Witteveldt, M.; Morissette, J.; den Nijs, H.C.M. 1999. Reproductive ecology of understory species in a tropical montane forest in Costa Rica. **Biotropica** 31:637-645.
- Zar, J.H. 1999. **Bioestatistical analysis**. New Jersey, 4<sup>rd</sup>. Princt-Hall.

## CAPÍTULO 3

**Efeito da fragmentação florestal no sucesso reprodutivo e na diversidade genética de *Psychotria hastisepala* Müll. Arg. (Rubiaceae)**

## Resumo

Este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos da fragmentação no sucesso reprodutivo e na diversidade genética de *Psychotria hastisepala*. As análises foram conduzidas em um total de 91 indivíduos provenientes de sete fragmentos florestais da microrregião de Viçosa - MG. A avaliação do sucesso reprodutivo foi realizada por meio da contagem do número de frutos e de sementes obtidos de até cinco inflorescências coletadas aleatoriamente de cada um dos 91 indivíduos após polinização natural. O sucesso reprodutivo de indivíduos do morfo brevistila foi significativamente superior àquele encontrado em indivíduos do morfo longistila para todos os fragmentos analisados. Não houve correlação significativa entre sucesso reprodutivo e tamanho do fragmento onde os indivíduos foram amostrados. As análises de diversidade genética foram conduzidas por meio de marcadores ISSR, utilizando-se dez primers que possibilitaram a obtenção de 89 bandas polimórficas. A porcentagem de polimorfismo entre fragmentos variou entre 29,21 até 77,53, sendo que a média foi de 60,99 %. As médias dos índices de diversidade genética de Nei e de diversidade de Shannon entre fragmentos foram 0.215 e 0.322, respectivamente; enquanto que ao nível de espécies estes índices foram 0.366 e 0.538. Resultados da AMOVA demonstraram que 64.48 % da variação genética encontra-se dentro dos fragmentos e que 35.52 % encontra-se entre fragmentos. A AMOVA revelou também que não houve diferenças significativas de variação genética quando fragmentos que apresentaram maior sucesso reprodutivo foram contrastados com fragmentos de menor sucesso reprodutivo. De maneira similar, a AMOVA revelou não haver diferenças significativas de variação genética quando indivíduos amostrados em fragmentos de maior tamanho foram contrastados com indivíduos amostrados em fragmentos menores. A distância genética não está correlacionada com distância geográfica dos fragmentos.

## Efeito da fragmentação florestal no sucesso reprodutivo e na diversidade genética de *Psychotria hastisepala* Müll. Arg. (Rubiaceae)

### Introdução

No bioma Floresta Atlântica, a principal causa da perda da diversidade genética é a destruição de habitats, provocada pela fragmentação (Pinto et al., 2006). As alterações no tamanho, na forma e na distribuição dos habitats afetam a taxa de extinção, o tamanho das populações locais (Schneider, 2003) e o sucesso reprodutivo de espécies vegetais (Cunningham, 2000b; Wolf & Harrison, 2001, Donaldson et al., 2002), alterando também a sua estrutura genética (Cascante et al., 2001; Fuchs et al., 2002).

De acordo com Fahrig (2003), as probabilidades de ocorrência de polinização e de dispersão entre os fragmentos são dependentes de fatores que atuam em conjunto, tais como, o grau de isolamento do fragmento, a capacidade intrínseca de dispersão que cada espécie apresenta e a qualidade da matriz, ou seja, toda e qualquer composição vegetal ou de outra natureza que circunde os remanescentes florestais e apresente fisionomia diferente deles (Olifiers & Cerqueira, 2006).

Espécies vegetais, em fragmentos florestais isolados, tendem ao cruzamento entre indivíduos aparentados, ou seja, ao endocruzamento (Schneider, 2003). Esse processo contribui para o aumento da similaridade genética entre indivíduos de uma mesma população e, conseqüentemente, da proporção de *loci* em homozigose. O aumento da homozigose favorece a expressão de alelos recessivos deletérios e diminuição do valor adaptativo de *loci* codominantes, podendo causar a diminuição da capacidade de adaptação dos indivíduos às variações ambientais, provocadas por fatores bióticos e abióticos (Hendrick et al., 1996).

O endocruzamento, entretanto, tende a ocorrer em espécies com flores perfeitas e autocompatíveis e é facilitado pela autopolinização. Espécies dióicas, distílicas (mais detalhes em Barrett, 1992) e auto-incompatíveis, por outro lado, são dependentes de polinizadores, o que as tornam mais susceptíveis à fragmentação florestal (Murcia, 1996). As plantas que dependem de polinizadores para a frutificação, e esses não se deslocam entre fragmentos, tendem à endogamia e à redução da variabilidade genética ou à extinção local (Kearns et al., 1998). Diante do exposto, é importante a identificação dos padrões da diversidade genética de espécies vegetais para o entendimento da biodiversidade, visto que o potencial de

uma planta em responder às mudanças ambientais dependerá da extensão e do tipo de sua diversidade genética (Martinelli, 2006).

*Psychotria hastisepala* é distílica (Pereira et al., 2006) e, no município de Viçosa, Zona da Mata mineira, no qual foram coletados os dados para o presente estudo, ocorre em baixadas, em áreas sombreadas e úmidas, de sub-bosques de fragmentos florestais. A vegetação original desse município era constituída por florestas contínuas, inseridas nos domínios da Floresta Atlântica, classificada como Floresta Estacional Semidecidual Submontana (Veloso et al., 1991). Posteriormente, essa vegetação foi substituída pelo cultivo de café e a cobertura vegetal predominante é de pastagem de capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.) e matas secundárias, em diferentes estádios de sucessão (Valverde, 1958).

Pereira (1999) mapeou 1.114 polígonos no município de Viçosa e nos seus distritos (Silvestre, Cachoeira de Santa Cruz e o povoado de São José do Triunfo), dividindo-os em sete classes: áreas urbanas; áreas agrícolas e de pastagens; culturas perenes; eucaliptos; capoeirinha; capoeira; e mata. Essa última classe engloba 474 fragmentos florestais, 434 deles pertencentes ao município de Viçosa (Pereira, 1999). Esses fragmentos ocupam cerca de 33% da região (Ribon, 1998; Pereira, 1999) e cerca de 60% deles encontram-se isolados (Pereira, 1999). Muitos fragmentos que ocorrem nessa microrregião possuem cerca de 20-60 anos de idade; no entanto, alguns podem variar entre 70-90 anos. A vegetação primária é rara, ocorrendo em menos de 1% dos fragmentos (Ribon et al., 2003).

Marcadores ISSR (*inter-simple sequence repeat*) (Zietkiewicz et al., 1994) são amplamente utilizados em estudos de diversidade genética por não necessitar de informação prévia da seqüência de DNA, ter baixos custos de desenvolvimento e os procedimentos laboratoriais podem ser transferidos para qualquer espécie de planta. Os *primers* de ISSRs são seqüências de microsatélite, ancoradas ou não na extremidade 5' ou 3' por nucleotídeos degenerados. A adição de diferentes bases nas extremidades 5' ou 3' torna seu sítio de ligação mais específico e reproduzível (Zietkiewicz et al., 1994; Fang & Roose, 1997). Os primers de ISSRs amplificam a região entre os dois sítios de ligação. *Indels*, perda ou ganho de sítios de ligação dentro da região amplificada são detectados como bandas polimórficas (Yang et al., 1996). Esta técnica tem demonstrado ser uma poderosa ferramenta para a investigação da variação genética dentro de espécies (Wolfe & Liston, 1998). A natureza hipervariável dos marcadores ISSR e o seu potencial para estudos em nível de populações têm sido registrados em estudos de populações naturais (Esselman et al., 1999).

Este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos da fragmentação no sucesso reprodutivo e na diversidade genética de *Psychotria hastisepala*, em fragmentos florestais de Viçosa e responder às seguintes questões: 1) Há diferenças no sucesso reprodutivo, em cada fragmento, quando se compara os morfos brevistilo e longistilo? 2) O sucesso reprodutivo é dependente do tamanho da área do fragmento? 3) Há correlação entre sucesso reprodutivo e variabilidade genética existente nos fragmentos? 4) A distância genética se correlaciona com distância geográfica dos fragmentos?

## Material e Métodos

**Áreas de estudo** - O município de Viçosa apresenta altitude média de 690m (Leal-Filho, 1992), precipitação média anual de 1221 mm e temperatura média de 19 a 22°C (Castro, 1980). O clima, segundo Köppen, é do tipo Cwa, mesotérmico úmido, com verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos.

Durante o ano de 2005, foram organizadas expedições em 18 fragmentos florestais, para verificar a ocorrência de *P. hastisepala*. Os critérios de seleção foram a maior similaridade florística e o seu estágio de sucessão, segundo Ribon (1998). *P. hastisepala* foi encontrada em apenas sete fragmentos e estes foram definidos como áreas de estudo (Fig. 1, Tabela 1). Neles foi quantificado o número de indivíduos de cada morfo floral e observado o tipo de matriz. Com auxílio de GPS, foi determinado o posicionamento geográfico de cada fragmento (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação de sete fragmentos florestais (com abreviação), com populações de *Psychotria hastisepala* no município de Viçosa, Minas Gerais, e sua matriz, localização geográfica e área.

Fragmento florestal	Matriz	Coordenadas	Área do fragmento (ha)
Bárbara Rubim (BR)	Pastagem	20° 49'53.9" S 42° 50'59.1" W	4,1
Sítio Cristais (SC)	Pastagem e eucalipto	20° 46'47.5" S 42° 50'01.5" W	17,1
Sítio Sr. Agostinho (SA)	Café, eucalipto pastagem e rodovia	20° 45'50.8" S 42° 50'18.9" W	25,1
Sítio Sr. Nico (SN)	Milho, matas e pastagem	20° 47'37.2" S 42° 50'42.1" W	38,8
Mata da Biologia (MB)	Cidade e pastagem	20° 45'23.7" S 42° 52'19.6" W	73,5
Quim-Quim (QQ)	Milho, pastagem e rodovia	20° 49'51.7" S 42° 55'50.9" W	145,0
Mata Paraíso (MP)	Café e pastagem	20° 48'07.3" S 42° 51'29.3" W	168,7

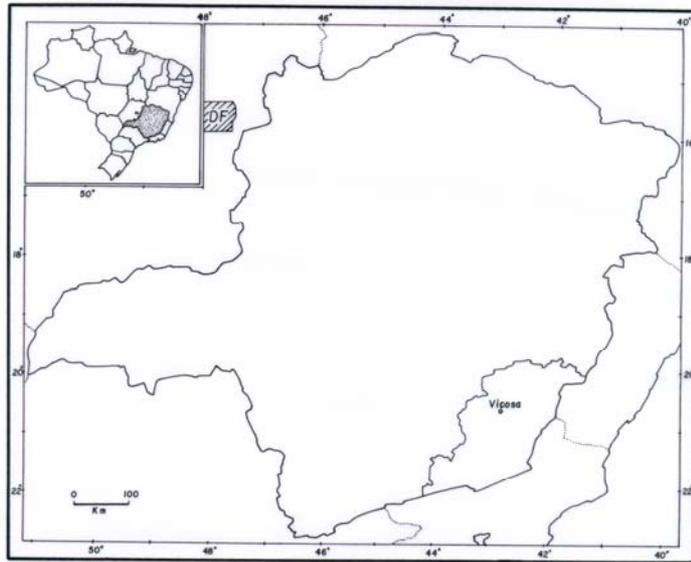


Figura 1. Localização do município de Viçosa e dos fragmentos florestais, utilizados no presente estudo: A – Mapa do Brasil, com o Estado de Minas Gerais e o município de Viçosa, na Zona da Mata mineira, em destaque; B – Distribuição dos sete fragmentos florestais (em azul), no município de Viçosa. As abreviações de cada fragmento estão de acordo com a Tabela 1.

**Espécie estudada** - *Psychotria hastisepala* é arbustiva e ocorre em baixadas, em áreas sombreadas e úmidas, de sub-bosques de fragmentos florestais. Suas flores são agrupadas em inflorescências terminais, com brácteas e bractéolas involucrais paleáceas, que permanecem na inflorescência até a frutificação. A corola é branca, tubulosa, com 10,0 - 15,5 mm de comprimento e suas flores em antese duram 24 horas (Pereira et al., 2006). É distílica, ou seja, apresenta hercogamia recíproca e sistema de auto-incompatibilidade intramorfos (Pereira et al., 2006), por isso, a produção de sementes, resulta obrigatoriamente de polinizações intermorfos, realizadas por insetos polinizadores (capítulos 1 e 2). Também apresenta reprodução vegetativa (obs. pes.). No Brasil, possui ampla distribuição, ocorrendo no sul do Pará, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Andersson, 1992).

**Sucesso reprodutivo** - O sucesso reprodutivo, aqui definido como a produção de frutos e de semente, segundo (Dafni, 1992), foi verificado em 2005. Em todos os fragmentos estudados, foram etiquetados até 10 indivíduos de cada morfo. Na tentativa de excluir clones, cada indivíduo etiquetado encontrava-se a uma distância mínima de 3m do indivíduo mais próximo. Nos indivíduos amostrados, foram coletados, aleatoriamente, até cinco inflorescências com frutos desenvolvidos, oriundos de polinização natural. Os frutos e as sementes (uma ou duas sementes), de cada inflorescência, foram contados. A média da produção de sementes por fragmento foi obtida pelo número total de sementes produzidas nos dois morfos, divididas pelo número de indivíduos amostrados em cada fragmento.

**Extração de DNA** - O material vegetal para extração de DNA foi coletado dos mesmos indivíduos utilizados para o estudo do sucesso reprodutivo. DNA genômico total foi extraído de aproximadamente 100 mg de folhas jovens, usando protocolo de CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987), com poucas modificações. O tecido foliar foi macerado em almofariz na presença de nitrogênio líquido. O material foi transferido para microtubos de 2 mL, ao qual foram adicionados 800 µL de tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M cloreto de sódio; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 2% polivinilpirrolidona (PVP) e 2% β-mercaptoetanol) e incubado a 65<sup>o</sup>C por 5 minutos. A seguir, foram adicionados 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v:v). Os tubos foram agitados por 1 minuto em vórtex e centrifugados a 13.000 rpm em centrífuga 5415D (Eppendorf) por 10 minutos. O sobrenadante foi

transferido para um novo tubo e precipitado com o mesmo volume de isopropanol gelado por 12 horas. Após este período, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos e o precipitado foi lavado uma vez com etanol 70% e uma vez com etanol 95%. Depois da secagem por 15 minutos em temperatura ambiente, o precipitado foi ressuscitado em 200 µL de TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) contendo RNase (40 µg/mL) e a solução incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, a solução foi precipitada com a adição de acetato de amônio 7,5 M na proporção 1:10 (acetato:DNA ressuscitado) e 2/3 do volume de isopropanol gelado por 4 horas. A seguir, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado uma vez com etanol 70% e uma vez com etanol 95% e ressuscitado em 40-60 µL de TE.

A qualidade e a concentração do DNA foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% com marcador de DNA λ. As soluções estoque foram preparadas por diluições com água ultrapura autoclavada, de forma a se obter uma solução de trabalho com concentração final de aproximadamente 10 ng/µL de DNA genômico.

**Seleção de primers e otimização do PCR** - Vinte *primers* de ISSR obtidos da Universidade de British Columbia (UBC set nº 9) foram testados para amplificação inicial. Nestes primers foram examinadas as condições ótimas para detectar ISSRs em amostras de DNA de *P. hastisepala* (Tabela 2). Os efeitos da concentração de *primer*, DNA template, MgCl<sub>2</sub>, formamida e a influência da temperatura de anelamento na reprodutibilidade do padrão de bandamento foram analisados (Tabela 2).

Tabela 2. *Primers* usados para amplificação de ISSR em 91 indivíduos de *Psychotria hastisepala* amostrados em sete fragmentos florestais de Viçosa, MG. Temperatura de anelamento (T<sub>m</sub>), número de bandas (NB)

Código	Primer		NB
	Seqüência (5' - 3')*	T <sub>m</sub> (°C)	
UBC 807	(AGA GAG) <sub>5</sub> GT	46	8
UBC 808	(AGA GAG) <sub>5</sub> GC	48	7
UBC 834	(AGA GAG) <sub>5</sub> GYT	47	10
UBC 835	(AGA GAG) <sub>5</sub> GYC	50	9
UBC 836	(AGA GAG) <sub>5</sub> GYA	47	10
UBC 844	(CTC TCT) <sub>5</sub> TRC	51	9
UBC 848	(CAC ACA) <sub>5</sub> ARG	48	9
UBC 873	(GAC AGA) <sub>5</sub> A	51	9
UBC 880	(GGA GAG GAG AGG AGA)	48	8
UBC 891	(HVH TGT GTG TGT GTG)TG	52	10
Total	10		89

\*Y = C ou T; R = A ou G; H = A, C ou T; V = A, C ou G

**PCR - Amplificação de ISSR** - Amplificações foram realizadas em um volume total de 20 $\mu$ L contendo: Tris-HCl 10 mM (pH8.3); 50 mM KCl; 0.1% de tween 20; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> ; 0,2 mM de cada dNTP; 0,2  $\mu$ M de *primer*, 0,75 U de Taq DNA polimerase, formamida 2%, aproximadamente 30 ng de DNA template e água ultrapura. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador GeneAmp, PCR System 9700 (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 45-53 °C (dependendo *do primer* utilizado) por 45 segundos e 72 °C por 1,5 minutos e 1 ciclo de extensão final de 72 °C por 7 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de corrida TBE 1X (89,15 mM de Tris Base; 88,95 mM de Ácido Bórico e 2,23 mM EDTA), em voltagem constante de 110 V por quatro horas. A coloração do gel foi feita com brometo de etídeo (0,6 ng/mL). Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados, por comparação, com o marcador molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Em seguida, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta usando o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene).

**Análise de dados moleculares** - Marcadores de ISSR são dominantes e, portanto foi assumido que cada banda representa o fenótipo de um único locus (Williams et al., 1990). Os fragmentos de ISSR amplificados foram codificados como caracteres binários: presença (1) ou ausência (0) de bandas homólogas. Apenas bandas robustas e inequívocas foram avaliadas, bandas com fraca intensidade ou coalescentes com outras bandas foram excluídas. Os dados da matriz de presença/ausência resultante foram analisados utilizando POPGENE v. 1.31 (Yeh et al., 1999) para estimar os seguintes parâmetros de diversidade: porcentagem de locus polimórficos P(%), índice de diversidade de Shannon (I) e a diversidade gênica de Nei (H<sub>E</sub>) (Nei, 1973). P, I e H<sub>E</sub> foram calculados em dois níveis: em nível de população e de espécie.

A análise de variância molecular (AMOVA) foi usada para revelar a distribuição da variabilidade genética dentro e entre os fragmentos florestais, onde a diversidade genética total foi dividida em dois níveis hierárquicos distintos, diferença entre fragmentos, entre indivíduos dentro dos fragmentos. A AMOVA foi realizada de acordo com Excoffier et al. (1992), com o auxílio do programa Arlequin 3.01 (Schneider et al., 2000). A significância da diferenciação foi testada com 1000 permutações, onde P denota a probabilidade de se observar um valor ao acaso igual ou maior ao valor observado.

O programa NTSYS-pc (Rohlf, 2005) foi empregado para a realização da análise de agrupamento baseado na média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA), empregando o coeficiente de Dice que é similar ao coeficiente de Nei e Li (1972). O coeficiente de Dice é definido como  $2a/2a+b+c$ , onde  $a$  é soma das duplas presenças, para dois setores comparados (1-1) com peso duplo tanto no numerador quanto no denominador,  $b$  e  $c$  são os pares discordantes entre os setores, correspondendo as duas combinações de presença e ausência (1-0; 0-1). O índice de similaridade de Dice não atribui qualquer significado genético para a coincidência de ausência de bandas.

O teste de Mantel foi executado usando o programa Genes , baseado em 500 simulações.

Para construir fenogramas representativos das distâncias genética entre fragmentos, a matriz dos valores de  $F_{ST}$  par-a-par dos fragmentos foi gerada usando o Arlequin 3.01 (Excoffier *et al.*, 2006), bem como a matriz das distâncias genéticas de Nei (1973) pelo POPGENE 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

## Resultados

**Sucesso reprodutivo** - O sucesso reprodutivo dos morfos de *P. hastisepala* está apresentado na Tabela 3. O número de frutos por inflorescência e o total de sementes produzidas foi significativamente maior no morfo brevistila, em todos os fragmentos estudados (Tabela 3). Os números de frutos que apresentaram duas sementes foram significativamente maiores em todos os fragmentos e em ambos os morfos, exceto no longistilo do fragmento QQ; esse morfo produziu 68,4% de frutos com uma semente (Tabela 3).

O número médio de sementes produzidas por indivíduo, em cada fragmento, encontra-se na Tabela 4. O teste de Mantel não detectou correlação entre o tamanho da área e o número de sementes produzidas ( $r = -0,2057$ ,  $P = 0,6389$ ), especialmente porque no menor fragmento (BR) foi obtida a maior média de sementes produzidas por indivíduo (Tabela 4).

**Polimorfismo de ISSR e diversidade genética dentro de fragmentos** - Os dez *primers* utilizados produziram 89 bandas (Tabela 2) e 98,88% de bandas polimórficas, para as 91 amostras analisadas. A porcentagem de bandas polimórficas - P(%) - foi muito diversificada entre os fragmentos florestais, variando 29,1% (SC) a 77,5% (MP) (Tabela 54). O índice de Nei ( $H_E$ ) e de Shannon (I) mostraram a mesma tendência, ou seja, os maiores índices de diversidade genética

estão nos fragmentos com maior número de indivíduos amostrados (Tabela 5), os quais também apresentaram maior sucesso reprodutivo, independentemente do tamanho do fragmento (Tabela 3, 4). Observa-se, portanto, que a variabilidade genética existente tende a correlacionar positivamente com o sucesso reprodutivo. A análise da variabilidade genética, entre os morfos florais, foi similar para os índices de Nei (0,33 B e 0,31 L) e de Shannon (0,49 B e 0,46 L). Os resultados da AMOVA demonstram que a maior variação genética dos indivíduos de *P. hastisepala* pode ser atribuída a diferenças entre indivíduos dentro dos fragmentos (64,48%) e 35,52% desta diferença reside entre os fragmentos florestais (Tabela 6). Quando a variância foi dividida entre os fragmentos que apresentaram maiores e menores sucessos reprodutivos, 37,9% da variabilidade foram atribuídas às populações dentro dos grupos de fragmentos e 65,4% às diferenças individuais dentro das populações (Tabela 7). O valor (-3,35%) encontrado entre os fragmentos é interpretado como ausência de variação (Tabela 7). Quando se analisa a variabilidade dentro os fragmentos florestais com maiores e menores áreas, a maior porcentagem de variação (63,47%) é atribuída às populações dentro dos fragmentos (Tabela 8).

Tabela 3. Sucesso reprodutivo por morfos de *Psychotria hastisepala* em sete fragmentos florestais de Viçosa, Minas Gerais, no ano de 2005.

Fragmento <sup>1</sup> (área em ha)	Morfo floral <sup>2</sup> (no. ind.)	Inflo./ Frutos (n°)	Frutos (%)		Total semente	P <sup>3</sup>
			1 semente	2 sementes		
BR (4,1)	B (10)	46 / 288	25,00	75,00	504	< 0, 05
	L (10)	37 / 206	23,30	76,70	364	
SC (17,1)	B (01)	05/ 19	15,80	84,20	35	< 0, 05
	L (02)	10 / 1	0,00	100,0	2	
SA (25,1)	B (03)	15/ 48	8,34	91,66	92	< 0, 05
	L (05)	25 / 18	16,60	83,40	33	
SN (38,8)	B (04)	20 / 75	9,30	90,70	143	< 0, 05
	L (02)	7 / 20	15,00	85,00	37	
MB (73,5)	B (10)	50 / 215	9,40	90,60	410	< 0, 05
	L (10)	50 / 130	9,20	90,80	248	
QQ (145,0)	B (06)	27 / 74	35,10	64,90	122	< 0, 05
	L (08)	33 / 19	68,40	31,60	25	
MP (168,7)	B (10)	50 / 229	6,10	93,90	444	< 0, 05
	L (10)	50 / 121	10,74	89,26	229	

<sup>1</sup>Consultar tab. 1 para as abreviações

<sup>2</sup>B = brevistila; L= longistila

<sup>3</sup>Diferenças estatísticas foram determinadas pela análise de variância one-way Anova

Tabela 4. Média da produção de sementes por indivíduos, em sete fragmentos florestais em Viçosa, Minas Gerais.

Fragmento <sup>1</sup>	Área (ha)	Indivíduos amostrados (no.)	Sementes/indivíduo	
			$\bar{X}$	DP
BR	4,1	20	43,40	± 31,82
SC	17,1	03	12,30	± 19,65
SA	25,1	08	15,62	± 25,16
SN	38,8	06	30,00	± 21,11
MB	73,5	20	32,90	± 31,90
QQ	145,0	14	10,64	± 15,72
MP	168,7	20	33,65	± 22,76

<sup>1</sup>Consultar tab. 1 para as abreviações

**Polimorfismo de ISSR e diversidade genética dentro de fragmentos** - Os dez *primers* utilizados produziram 89 bandas e 98,88% de bandas polimórficas, para as 91 amostras analisadas. A porcentagem de bandas polimórficas - P(%) - foi muito diversificada entre os fragmentos florestais, variando 29,1% (SC) a 77,5% (MP) (Tabela 4). O índice de Nei ( $H_E$ ) e de Shannon (I) mostraram a mesma tendência, ou seja, os maiores índices de diversidade genética estão nos fragmentos com maior número de indivíduos amostrados (Tabela 5). A análise da variabilidade genética, entre os morfos florais, foi similar para os índices de Nei (0,33 B e 0,31 L) e de Shannon (0,49 B e 0,46 L).

Os resultados da AMOVA demonstram que a maior variação genética dos indivíduos de *P. hastisepala* pode ser atribuída a diferenças entre indivíduos dentro dos fragmentos (64,48%) e 35,52% desta diferença reside entre os fragmentos florestais (Tabela 6). Quando a variância foi dividida entre os fragmentos que apresentaram maiores e menores sucessos reprodutivos, 37,9% da variabilidade foram atribuídas às populações dentro dos fragmentos e 65,4% às diferenças individuais dentro das populações (Tabela 7). O valor (-3,35%) encontrado entre os fragmentos é interpretado como ausência de variação (Tabela 7). Quando se analisa a variabilidade dentre os fragmentos florestais com maiores e menores áreas, a maior porcentagem de variação (63,47%) é atribuída a populações dentro dos fragmentos (Tabela 8).

Tabela 5. Média da variabilidade genética de *Psychotria hastisepala*, detectada por análises de ISSR, dentro de fragmentos florestais, em Viçosa, Minas Gerais.

<b>Fragmentos<sup>1</sup> (área em ha)</b>	<b>N</b>	<b>P (%)</b>	<b>H<sub>E</sub></b>	<b>I</b>
BR (4,1)	20	76,40	0,263	0,394
SC (17,1)	03	29,21	0,129	0,185
SA (25,1)	08	53,93	0,201	0,299
SN (38,8)	06	49,44	0,189	0,280
MB (73,5)	20	75,28	0,250	0,379
QQ (145,0)	14	65,17	0,220	0,333
MP (168,7)	20	77,53	0,255	0,386
Média		60,99	0,215	0,322
Espécie		100	0,366	0,538

<sup>1</sup>Consultar tab. 1 para as abreviações

N = tamanho da amostra (no. de indivíduos); P (%) = porcentagem de polimorfismo; H<sub>E</sub> = Índice de diversidade genética de Nei; I = Índice de diversidade genética de Shannon

Tabela 6. Análises de variância molecular (AMOVA) para 91 indivíduos *Psychotria hastisepala* em sete fragmentos florestais em Viçosa, Minas Gerais.

<b>Fonte de variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>Soma de quadrados</b>	<b>Componentes de variância</b>	<b>Varição (%)</b>	<b>P*</b>
Entre fragmentos	6	464,259	5,439	35,52	<0,001
Dentro dos fragmentos	84	829,290	9,872	64,48	<0,001
Total	90	1293,549	15,311		

\*Valores de P são as probabilidades de ter um componente de variância maior que os valores observados ao acaso. As probabilidades foram calculadas por 1000 permutações ao acaso.

Tabela 7. Análises de variância molecular (AMOVA) para 91 indivíduos *Psychotria hastisepala* entre fragmentos florestais de maior sucesso reprodutivo (MP, MB e BR)<sup>1</sup> vs fragmentos de menor sucesso reprodutivo (SA, SC, SN e QQ)<sup>1</sup>, em Viçosa, Minas Gerais.

<b>Fonte de variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>Soma de quadrados</b>	<b>Componentes de variância</b>	<b>Varição (%)</b>	<b>P*</b>
Entre grupos de fragmentos	1	65,254	-0,505	-3,35	<0,001
Entre fragmentos dentro dos grupos	5	399,00	5,716	37,90	<0,001
Dentro dos fragmentos	84	829,290	9,872	65,45	<0,001
Total	90	1293,54	15,084		

<sup>1</sup>Consultar tab. 1 para as abreviações

\*Valores de P são as probabilidades de ter um componente de variância maior que os valores observados ao acaso. As probabilidades foram calculadas por 1000 permutações ao acaso.

Tabela 8. Análises de variância molecular (AMOVA) para 91 indivíduos *Psychotria hastisepala* entre fragmentos florestais de maior área (MP, MB e QQ)<sup>1</sup> vs fragmentos de menor área (SA, SC, SN e BR)<sup>1</sup>, em Viçosa, Minas Gerais.

Fonte de variação	G.L.	Soma de quadrados	Componentes de variância	Varição (%)	P*
Entre grupos de fragmentos	1	121,74	0,62	4,01	<0,001
Entre fragmentos dentre dos grupos	5	342,51	5,06	32,52	<0,001
Dentro das fragmentos	84	829,29	9,9	63,47	<0,001
Total	90	1293,55	15,5		

<sup>1</sup>Consultar tab. 1 para as abreviações

\*Valores de P são as probabilidades de ter um componente de variância maior que os valores observados ao acaso. As probabilidades foram calculadas por 1000 permutações ao acaso.

O teste de Mantel não detectou correlação ( $r = - 0,042$ ,  $P = 0,267$ ) entre matriz de distância genética e distância geográfica (Tabela 9). Entretanto, houve um agrupamento de indivíduos e populações geneticamente mais próximas (Fig. 2).

Tabela 9. Matriz de distância geográfica (em Km, diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) obtida por valores de  $F_{ST}$  par a par, entre sete fragmentos florestais de Viçosa, Minas Gerais, com populações de *Psychotria hastisepala*.

Fragmentos <sup>1</sup>	MP	SA	BR	QQ	SN	SC	MB
MP	****	4,66	3,40	8,19	1,68	3,61	5,27
SA	0,4425	****	7,55	12,16	3,28	1,77	3,63
BR	0,2672	0,3567	****	8,45	4,24	5,98	8,67
QQ	0,3123	0,4379	0,1707	****	9,88	11,59	10,32
SN	0,3689	0,4164	0,3721	0,4538	****	1,97	5,92
SC	0,4312	0,4830	0,3945	0,4709	0,4305	****	4,82
MB	0,3587	0,3902	0,3417	0,4053	0,3032	0,4406	****

<sup>1</sup>Consultar tab. 1 para as abreviações

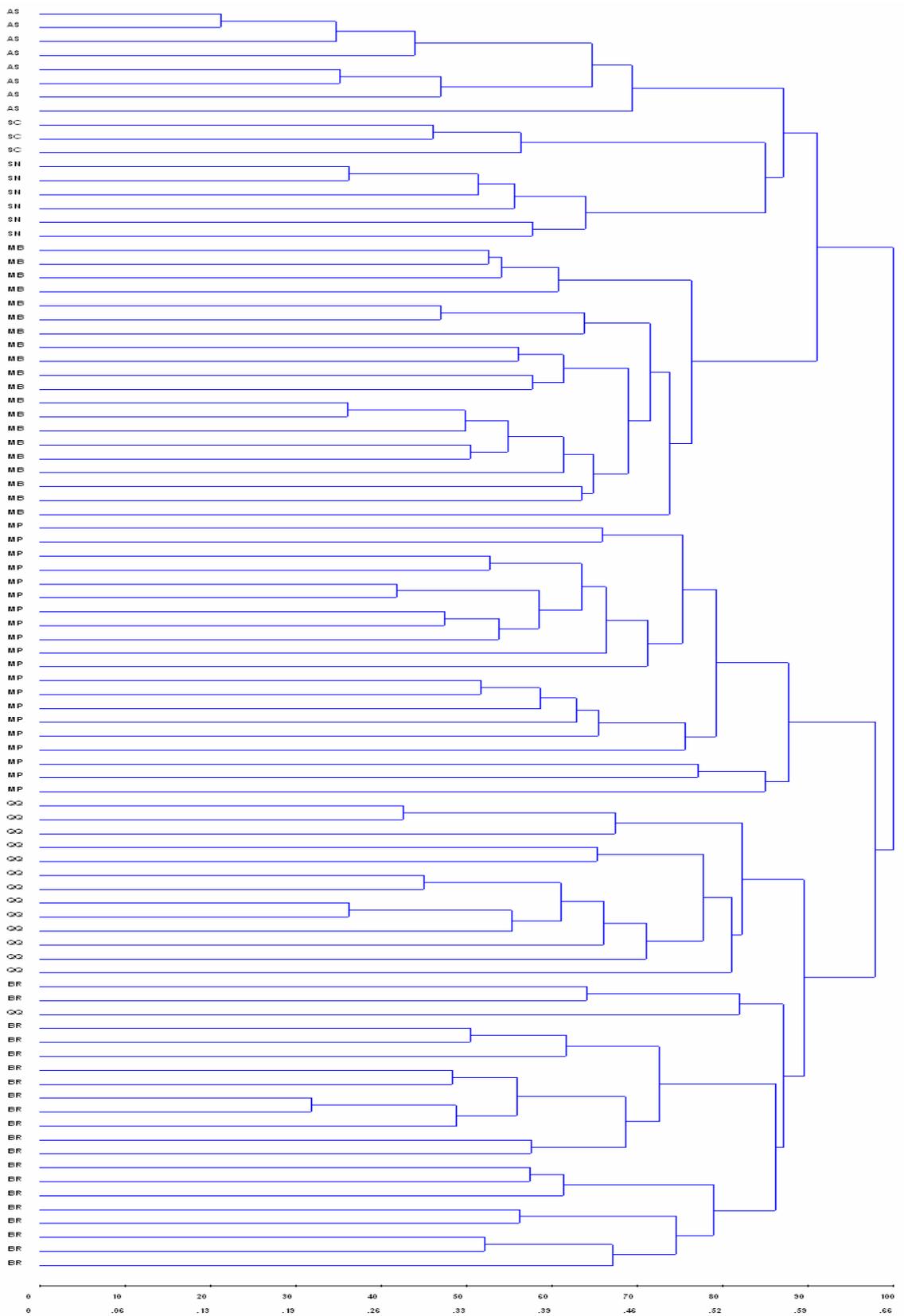


Figura 2. Dendrograma de agrupamento de indivíduos dentro das populações de *Psychotria hastisepala*, pelo método UPGMA, baseado na distância genética de Nei & Li (1979). Consultar a tabela 1 para as abreviações.

## Discussão

Os resultados, do presente estudo, indicam que o sucesso reprodutivo de *P. hastisepala* independe do tamanho do fragmento e é afetado, principalmente, por quatro fatores: perda de hábitat, número de indivíduos amostrados, presença de polinizadores e a qualidade da matriz.

A perda do hábitat (áreas de baixadas, em locais sombreados e úmidos) de *P. hastisepala* determinou a ocorrência dessa espécie, uma vez que foi registrada em apenas 38% dos 18 fragmentos visitados. Esse fato corrobora a suposição de Fahrig (2003), o qual mencionou que, além da fragmentação, a perda de hábitats é responsável pela ameaça de extinção da maioria de espécies neotropicais. De fato, a extinção de *P. hastisepala*, no município de Viçosa, é uma constatação, dado ao pequeno número de fragmentos, nos quais essa espécie foi observada.

A tendência de maior sucesso reprodutivo (média de 32,90 a 43,40 sementes/indivíduo) de *P. hastisepala* em fragmentos com maior número de indivíduos amostrados (20) era esperada devido à maior disponibilidade de recursos florais, resultando em maior atratividade aos polinizadores, característica que tende a maximizar a frutificação (capítulo 1). Entretanto, a qualidade da matriz pareceu ser fator relevante no sucesso reprodutivo no fragmento SN, que apresentou baixo número de indivíduos amostrado (seis) e alta produção de sementes/indivíduo (média de 30). Esse fragmento, com 38,8 ha, tem uma mata como matriz (corredor ecológico), que deve ter favorecido a atuação de polinizadores. Por isso, a diferença da composição florística das matrizes, dos fragmentos estudados, parece influenciar a diversidade de polinizadores e o sucesso reprodutivo de *P. hastisepala*, semelhante ao que foi sugerido por Webb (1989). Sabe-se, que a matriz, geralmente, altera o micro-clima (Saunders et al., 1991) e influencia na diversidade e abundância de insetos (Gess & Gess, 1993), pois a disponibilidade de locais de nidificação para os polinizadores é alterada (Gess & Gess, 1993, Cane, 2001).

Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a matriz (pastagem) do menor fragmento BR (4,1 ha), no qual se obteve a maior produção de sementes/indivíduo (média de 43,40), não afetou a abundância e disponibilidade de polinizador. Esses resultados confirmaram as suposições de Donaldson et al. (2002), os quais mencionaram que os recursos florais para os polinizadores não declinam linearmente com o decréscimo do tamanho do fragmento e podem manter ou atrair uma diversidade de insetos polinizadores. Esses resultados estão relacionados ao bom estado de conservação do hábitat de

*P. hastisepala*, nesse fragmento, e de seus polinizadores, apesar de ser o menor dentre os analisados. Nele não foi observada a limpeza do sub-bosque, nem a presença de rebanhos bovinos e eqüinos. A presença de animais em fragmentos é comum na região de Viçosa, aumentando a degradação do fragmento florestal, já que o pisoteio excessivo e o pastoreio de plantas nativas de sub-bosque danificam consideravelmente esse estrato da vegetação (Ribon, 2003).

Além da qualidade da matriz e do grau de conservação dos fragmentos, o sucesso reprodutivo de *P. hastisepala* é dependente de disponibilidade de polinizadores, por se tratar de espécie auto-incompatível. Estudos do efeito da fragmentação no sucesso reprodutivo de espécies auto-incompatíveis têm sugerido que a produção de sementes é reduzida em pequenos fragmentos (Spears, 1987; Jennersten, 1988; Aguilar & Galeto, 2004), diferindo dos resultados obtidos. Como mencionado anteriormente, a produção média de sementes/indivíduo foi maior no fragmento de menor área. Estudos adicionais sobre os polinizadores nos demais fragmentos analisados, além do MP (capítulo 1), poderão esclarecer as diferenças dos sucessos reprodutivos de *P. hastisepala*.

O maior sucesso reprodutivo, produzido pelas flores brevistilas, em todos os fragmentos, pode estar relacionado aos dimorfismos morfológicos de espécies distílicas (veja Pereira et al., 2006). Nas flores longistilas, o estigma por estar exposto, fora do tubo da corola, pode favorecer uma maior deposição de pólen incompatível, uma vez que os polinizadores tendem a visitar seqüencialmente todas as flores do mesmo indivíduo (geitonogamia *sensu* Richards, 1997), tal como registrado em *P. hastisepala* (capítulo 1). Esse comportamento de visita causaria uma oclusão do estigma e estilete com grãos de pólen incompatíveis e impossibilitaria ou diminuiria as chances de germinação de grãos compatíveis, como observado por Barret & Glover (1985) na espécie heterostílica *Ponderia cordata*. Nas flores longistilas de *P. hastisepala* observou-se também herbivoria, ou seja, danos causados por coleópteros ao estigma (capítulo 2), diminuindo as possibilidades de fertilização. Todos esses fatores devem atuar sinergeticamente e causar as desigualdades, no sucesso reprodutivo, entre os morfos, em todos os fragmentos avaliados.

Os valores de diversidade genética apresentada por *P. hastisepala*, dentro dos fragmentos, foram superiores aos apresentados por outras espécies tropicais de polinização cruzada, como *Hymenaea coubaril* e *H. stigonocarapa* (Brandão, 2002) e *Mabea fistulifera* (Goulart et al., 2005), e de propagação vegetativa, como *Psammochloa villosa* (Li & Ge, 2001). Em geral, uma alta diversidade genética dentro das populações é esperada em espécies xenógamas (Nybom & Bartish,

2000). Por outro lado, espécies autógamas, como *Coffea arabica* (Rubiaceae), apresentaram valores relativamente altos de diversidade total e baixos valores de diversidade genética dentro das populações (Aga et al., 2005). Portanto, a maior divergência gênica dentro das populações de *P. hastisepala* pode ser explicada pela auto-incompatibilidade e pela sua propagação vegetativa; nesse último caso, devido à manutenção da variabilidade genética pelos clones, tal como registrado por Li & Ge (2005).

A quebra da correlação entre distância genética e distância geográfica entre as populações analisadas de *P. hastisepala*, pode ser resultado da deriva genética, em consequência do processo de fragmentação da área original de ocorrência da espécie, no município de Viçosa. Diferentemente do observado, Nybom & Bartish (2000) mencionaram que em espécies de polinização cruzada, tal como a espécie estudada, a diferenciação genética entre populações é positivamente correlacionada com a distância geográfica. No presente estudo, pode-se postular que houve ação da deriva genética, por meio do efeito de gargalo ou afunilamento genético, que ocasionou a extinção aleatória de alguns genótipos, resultando na sobrevivência de genótipos divergentes entre fragmentos. Esses genótipos ficaram submetidos aos efeitos da endogamia, dentro dos fragmentos, resultando em aumento relativo das diferenças genéticas entre eles.

## **Conclusões**

1. A manutenção do hábitat é o principal fator que determina a ocorrência *P. hastisepala* em um dado fragmento.
2. Em 62% dos fragmentos visitados em Viçosa, devido à perda do hábitat, *P. hastisepala* está extinta.
3. Em sete fragmentos estudados (38%), não existe uma correlação positiva entre o sucesso reprodutivo e o tamanho do fragmento.
4. Nesses fragmentos, a qualidade da matriz e a presença de polinizadores são determinantes para um maior sucesso reprodutivo.
5. O sucesso reprodutivo foi significativamente superior no morfo brevistilo, em todos os fragmentos estudados.
6. A maior variabilidade genética encontra-se dentro dos fragmentos.
7. O valor de  $F_{st}$  indica variação genética muito grande entre os fragmentos.
8. Não existe uma correlação positiva entre distância genética e distância geográfica entre os pares de fragmentos analisados.

## Referências

- Aga, E.; Bekele, E.; Bryngelsson. 2005. Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia. **Genetica**.124: 213-221.
- Andersson, L.A. 1992. A provisional checklist of Neotropical Rubiaceae. **Scripta Botanica Belgica** 1: 1-119.
- Barrett, S.C.H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: **Evolution and function of heterostyly**. Barret, S.C.H. (ed.). Berlim: Spring-Verlag, pp. 1-29.
- Brandão, R.L. 2002. **Variabilidade e estrutura genética de duas espécies vicariantes, *Hymenaea coubaril* (jatobá da mata) e *H. stigonocarpa* (jatobá do cerrado)**. Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado.
- Cane, J. H. 2001. **Habitat fragmentation and native bees: a premature verdict**. Conservation Ecology 5:<http://www.consecol.org/vol15/iss1/art3>.
- Cascante, A.; Quesada, M.; Lobo, J. 2001. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. **Conservation Biology** 16: 137-147.
- Castro, P.S. 1980. **Influência da cobertura florestal na qualidade de água de duas bacias hidrográficas na região de Viçosa, MG**. Piracicaba, SP: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Dissertação de Mestrado.
- Cunningham, S. A. 2000b. Effects of habitat fragmentation on the reproductive ecology of four plant species in Mallee woodland. **Conservation Biology** 14: 758-768.
- Dafni, A. 1992. **Pollination ecology - A practical approach**. Oxford: Oxford University Press, p. 36.
- Del-Claro, K.; Torezan-Silingardi, H.M. 2006. Comportamento animal, interações ecológicas e conservação. In: **Biologia da conservação: essências**. Rocha, C.F.D.; Bergallo, H.G.; Sluys, M.V.; Alves, M. A.S. (eds.). São Carlos: Rima Editora, pp.399-410.
- Donaldson J.; Nänni, I.; Zachariades, C. 2002. Effects of habitat fragmentation on pollinator diversity and plant reproductive success in Renosterveld shrublands of South Africa. **Conservation Biology** 16: 1267-1276.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. **Phytochemistry Bulletin** 19: 11-15.
- Esselman, E.J.; Jianqiang, L.; Crawford, D.J.; Windus, J.L.; Wolfe, A.D. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* spp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology** 8:443-451.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondria DNA restriction sites. **Genetics** 131: 479-491.
- Fahrig, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology and Systematics** 34: 487-515.
- Fang, D.Q.; Roose, M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics** 95:408-417.
- Fuchs, E.J.; Lobo, J.A.; Quesada, M. 2002. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. **Conservation Biology** 17: 149-157.
- Ganders, F.R. 1979. The biology of heterostyly. **New Zealand Journal of Botany** 17: 607-635.

- Gess, F. W.; Gess, S.K. 1993. Effects of increasing land utilization on species representation and diversity of aculeate wasps and bees in the semi-arid areas of Southern Africa. In: **Hymenoptera and biodiversity**. LaSelle, J.; Gauld, I.D. (eds.). United Kingdom: Wallingford, pp.83-113.
- Goulart, M.F.; Ribeiro, S.P.; Lovato, M.B. 2005. Genetic, morphological and spatial characterization of two populations of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae), in different successional stages. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 48: 275-284.
- Hartl, D.L.; Clark, A.G. 1997. **Principles of populations genetics**. Sunderland, 3<sup>rd</sup>. Sinauer Associates.
- Hendrick, P.W.; Lacy, R.C.; Allendorf, F.W.; Soulé, M.E. 1996. Directions in conservation biology: Comments on Caughley. **Conservation Biology** 10: 1312-1320.
- Jennersten, O. 1988. Pollination in *Dianthus deltoids* (Caryophyllaceae): effects of habitat fragmentation on visitation and seed set. **Conservation Biology** 2: 359-366.
- Kearns, C.A.; Inouye, D.W. 1997. Pollinators, flowering plants, and conservation biology. **Bioscience** 47: 297-307.
- Kearns, C.A.; Inouye, D.W.; Waser, N.M. 1998. Endangered mutualism: The conservation of plant-pollinator interactions. **Annual Review of Ecology and Systematics** 29: 83-112.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5:150-163
- Leal-Filho, N. 1992. **Caracterização do banco de sementes de três estágios de uma sucessão vegetal na Zona da Mata de Minas Gerais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 116p. Dissertação de Mestrado.
- Li, A.; Ge, S. Genetic variation and Clonal Diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers. **Annals of Botany** 87: 585-590.
- Martinelli, G. 2006. Manejo de populações e comunidades vegetais: Um estudo de caso na conservação de Bromeliaceae. In: **Biologia da conservação: essências**. Rocha, C.F.D.; Bergallo, H.G.; Sluys, M.V.; Alves, M. A.S. (eds.). São Carlos: Rima Editora, pp.479-503.
- Murcia, C. 1996. Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. In: **Forest patches in tropical landscapes**. Schellas, J.; Greenberg, R. (eds.). Washington: Island Press, pp. 19-36.
- Nei, M. 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations (Populations structure/genetic variability/heterozygosity/gene differentiation). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 70: 3321-3323.
- Nei M, Li W-H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy Science of the USA**, 76: 5269-5273.
- Nybohm, H.; Bartish, I.V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics** 3:92-98.
- Olifiers, N.; Cerqueira, R. 2006. Fragmentação de habitats: Efeitos históricos e ecológicos. In: **Biologia da conservação: essências**. Rocha, C.F.D.; Bergallo, H.G.; Sluys, M.V.; Alves, M. A.S. (eds.). São Carlos: Rima Editora, pp.261-279.
- Pereira, R.A. 1999. **Mapeamento e caracterização de fragmentos de vegetação arbórea e alocação de áreas preferenciais para sua interligação no município de Viçosa, MG**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 203p. Tese de Doutorado.
- Pereira, Z.V.; Vieira, M.F.; Carvalho-Okano, R.M. 2006. Fenologia de floração, morfologia floral e sistema de incompatibilidade em espécies distílicas de

- Rubiaceae em fragmento florestal do sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica** 29:471-480.
- Pinto, L.P.; Bedê, L.; Paese, A.; Fonseca, M.; Paglia, A.; Lamas, I. 2006. Mata Atlântica brasileira: Os desafios para conservação da biodiversidade de um *hotspot* mundial In: **Biologia da conservação: essências**. Rocha, C.F.D.; Bergallo, H.G.; Sluys, M.V.; Alves, M. A.S. (eds.). São Carlos: Rima Editora, pp.399-410.
- Ribon, R. 1998. **Fatores que influenciam a distribuição da avifauna em fragmentos de Mata Atlântica nas montanhas de Minas Gerais**. Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais, 116p. Dissertação de Mestrado.
- Ribon, R.; Simon, J.E.; Mattos, G.T. 2003. Bird extinctions in Atlantic Forest fragments of the Viçosa region, southeastern Brazil. **Conservation Biology** 17: 1727-1839.
- Richards, A.J. (1997) **Plant breeding systems**. London: Chapman & Hall, pp. 297 - 356.
- Rohlf, F.J. 2005. **NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. Exeter Publishing, Setauket, NY.
- Saunders, D.A.; Hobbs, R.J.; Margules, C.R. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. **Conservation Biology** 5: 18- 32.
- Schneider, M.P.C 2003. Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas . In: **Genética de populações naturais**. Rambaldi, D.M.; Oliveira, D.A.S. (orgs.). Brasília: MMA/SBF.
- Spears, E.E. 1987. Island and mainland pollination ecology of *Centrosema virginatum* e *Opuntia stricta*. **Journal Ecology** 75: 351-362.
- Tomimatsu, H.; Ohara, M. 2002. Effects of forest fragmentation on seed production of the understory herb *Trillium camschatcense*. **Conservation Biology** 16: 1277-1285.
- Valverde, O. 1958. Estudo regional da Zona da Mata, de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Geografia** Ano XX: 3-82.
- Veloso, H.P.; Rangel-Filho, A.L.R.; Lima, J.C.A. 1991. **Classificação da Vegetação Brasileira, Adaptada a um Sistema Universal**. Rio de Janeiro: IBGE.
- Webb, W.R. 1989. Studies on the invertebrate fauna of a fragmented heathland in Dorset, UK, and the implications for conservation. **Biological Conservation** 47: 153-165.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18: 6531-6535.
- Wolf, A.T.; Harrison, S.P. 2001. Effects of habitat size and patch isolation on reproductive success of the serpentine morning glory. **Conservation Biology** 15: 111-121.
- Wolfe, A.D.; Liston, A. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: **Molecular systematics of plants. II. DNA sequencing**. Soltis, D.E.; Soltis, P.S.; Doyle, J.J. eds. New York: Chapman and Hall, pp.43-86.
- Yang, W.; de Oliveira, A.C.; Godwin, I.; Schertz, K.; Bennetzen, J.L. 1996. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. **Crop Science** 36:1669-1676.
- Yeh, F.C.; Yang, R.; Boyle, T. 1999. **POPGENE**. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Release 1.31. University of Alberta, Edmonton, Canada.
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20:176-183.