

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biologia
Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal

**Efeito da distância da fonte de pólen no sucesso reprodutivo de *Esterhazyia splendida*
Mikan (Orobanchaceae)**

Carolina Ferreira Gomes

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eugênio Oliveira

Uberlândia – MG

Fevereiro–2012

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biologia
Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal

Efeito da distância da fonte de pólen no sucesso reprodutivo de *Esterhazya splendida*Mikan (Orobanchaceae)

Carolina Ferreira Gomes

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eugênio Oliveira

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Uberlândia – MG

Fevereiro – 2012

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biologia
Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal

Efeito da distância da fonte de pólen no sucesso reprodutivo de *Esterhazya splendida*Mikan (Orobanchaceae)

Carolina Ferreira Gomes

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente (Orientador)

Prof. Dr. Paulo Eugênio Oliveira (UFU)

Examinadores:

Dra. Marcela Yamamoto

Prof. Dra. Francielle Paulina de Araújo (UFU)

Dissertação aprovada em 15/02/2012

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer minha família por todo o apoio sempre em tudo o que eu resolvo fazer! Pelo incentivo, pelo carinho ao pintar a flor da *Esterhazya* no número de casa, pelas váááárias vezes que fiz vocês escanearem os artigos que esquecia em casa, por aguentar minha chatice e azedume por causa da dissertação, por entender as muitas e muitas vezes que não pude voltar pra casa por causa de trabalho de campo ou pelas vezes que pude ficar tão pouco tempo em casa por ter que voltar logo pra Uberlândia. Sem vocês nenhuma conquista até agora teria sido possível... Muito obrigada por tudo!

Não poderia deixar de agradecer a pessoa que tem sido meu porto seguro nesses últimos anos. Pedro! Obrigada por tudo! Pelo incentivo e apoio quando não consegui passar no mestrado em Ecologia, pelas incontáveis ajudas no campo, caronas para o Caça e Pesca e pelas mensagens que você me mandava pra não desanimar com o sol escaldante do Cerrado! Pelas tantas vezes que você me ajudou com a tal “maldita” da estatística, por ouvir as minhas milhares de reclamações sobre o mestrado e sobre o quanto deu tudo errado com o projeto inicial, e por me apoiar nessa “nova fase de coisas novas” da minha vida. Enfim! Obrigada por estar comigo sempre e por me ajudar a tornar meus sonhos realidade! E é claro que eu não poderia esquecer de agradecer à Doris e ao Heraldo, que sempre me trataram como uma filha, me ajudando sempre em tudo que precisei!

Gostaria de agradecer ao Paulo pela orientação e pelos conselhos durante esses anos, desde a graduação até aqui! Pelo apoio e pelas conversas quando estava desanimada com o trabalho! E principalmente pela paciência com o meu jeito “sucinto, resumido e sintético” de escrever!

Ao Emilio Bruna por ter nos recebido na Universidade da Flórida. Pelos conselhos, pelo apoio e por ter me ajudado tanto com a da escrita da dissertação! Pela amizade e pelos momentos de descontração que tivemos durante a nossa estadia em Gainesville. Gostaria de agradecer também a todos do “Tropical EcologyandConservationLab” pelas dicas e sugestões dadas para o meu trabalho! Agradeço ao Ernane, Fabiane, Rodolfo e Vítor por tornarem as coisas nas terras gringas menos difíceis e muito mais engraçadas! Go Gators!!!

Não posso deixar de falar aqui da sala mais legal e humilde de todas! A primeira turma do mestrado em Biologia Vegetal: Allisson, Rose, Gabi, Bets, Fer, Poly e Jamir! Quero dizer que foi muito bom conviver com vocês esses dois anos... Pena que passou rápido demais! Um agradecimento especial ao Allisson e à Rose pela amizade e por sempre me ajudarem quando precisei, principalmente com a “parte emocional” do mestrado!

Um agradecimento mais que especial para a grande amiga que fiz durante o mestrado, a Gabi! Quero aproveitar o espaço aqui pra agradecer toda a ajuda durante o tenebroso e gigante experimento de germinação! Pelas conversas, pelas palavras de otimismo (“Vai dar tudo certo, Carol”) e principalmente pela amizade!

Agradeço à Laura, pela amizade indispensável de sempre e pela companhia no campo, por ter sido minha estagiária por uns dias e ter me ajudado a repassar o esmalte nas flores de *Costus*! Pena que elas apodreceram depois...

Aos amigos das novas turmas da botânica (Danilo, Batata, Paula, Jamile e Ana Carol), ao povo da ecologia (Flávio, Kleber, Diego, Vanessa, Lorraina, Estevão, Cuca, Pietro e Frizzo) e aos meus filhos queridos, Saulo e Renato, agradeço pela companhia nos almoços no “Gato”, pelas risadas e pelas festas que tanto recarregavam as energias no fim de semana (ou não!).

Agradeço a todos os colegas do LAMOVI pelas conversas e pela ajuda com os experimentos.

Agradeço às professoras Marli Ranal e Denise Santana por terem me ajudado com os experimentos de germinação, e a todos do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal e do Laboratório de Sementes Florestais (em especial o Vanderley, que sempre estava disposto a ajudar e dar conselhos...e por ter me emprestado a “Margarida”).

Gostaria de agradecer à Francielle, primeiramente por ter aceitado participar da banca, pelos conselhos quando tentei trabalhar com *Costus*, pelas conversas tão divertidas e também pela ajuda com o experimento de germinação e dos tubos polínicos!

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia de Insetos Sociais (Leis), em especial ao Alan, Jorge e Flávio pelas caronas ao Panga, pela companhia durante as tardes e manhãs na casa dos alunos e também por me fazerem ficar com tanto medo de jararaca!

Aos funcionários do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia.

Às funcionárias Helena, Luiza e Nivia que sempre estavam dispostas a ajudar.

À Capes, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1.	Local de estudo	5
2.2.	Espécie estudada	5
2.3.	Delineamento experimental.....	6
2.3.1.	Densidade de plantas, fenologia de floração e oferta de néctar	6
2.3.2.	Tratamentos de polinizações controladas	6
2.3.3.	Crescimento de tubo polínico e fertilização.....	7
2.3.4.	Experimento de germinação.....	7
2.3.5.	Visitantes florais.....	8
2.4.	Análises estatísticas.....	8
3.	RESULTADOS.....	9
3.1.	Densidade, Fenologia de floração e oferta de néctar.....	9
3.2.	Polinizações controladas, germinação, crescimento do tubo polínico e fertilização.....	9
3.4.	Visitantes Florais.....	11
4.	DISCUSSÃO.....	14
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Imagem aérea da reserva do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia. Em asterisco, as duas populações de <i>Esterhazya splendida</i> utilizadas para o estudo	7
Figura 2: Efeito da distância de cruzamento na taxa de formação de frutos (%) (a), produção de sementes (b), Peso do fruto (c), comprimento (d) e largura do fruto(e), na germinação (f), no tamanho das plântulas (g) e na altura do hipocôtilo (h) de <i>E. splendida</i>	11
Figuras 3 a 14: Morfologia floral e reprodução de <i>E. splendida</i> . 3, 4 e 5. Diferentes tonalidades das flores variando desde o vermelho intenso até o laranja. 6. Seta indica frutos maduros de <i>E. splendida</i> . 7. Protrusão da radícula. 8. Plântula de <i>E. splendida</i> (seta indica cotilédone; letra h indica hipocôtilo). 9. Corte transversal do ovário de flor 48 horas após receber o tratamento de autopolinização - não há tubos polínicos alcançando os óvulos. 10. Corte transversal do ovário de flor 48 horas após receber o pólen de 50 metros de distância (seta indica tubos polínicos). 11. Corte transversal do ovário de flor 48 horas após receber o pólen de 250 metros de distância (seta indica tubos polínicos). 12. <i>Eupetomena macroura</i> visitando flor de <i>E. splendida</i> . 13. <i>E. macroura</i> apresentando comportamento territorial. 14. Abelha do gênero <i>Trigona</i> pilhando pólen	13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Comprimento, largura e peso dos frutos e número de sementes provenientes dos tratamentos de autopolinização manual, 50m, 250m e 2km. (n=50). (*Peso dos frutos + sementes).....	10
Tabela 2 : Proporção de germinação, tamanho das plântulas e altura do hipocótilo dos tratamentos de autopolinização manual, 50m, 250m e 2km.....	10
Tabela 3 : Número de visitas, número de flores e duração das visitas realizadas por <i>Amazilia</i> sp., <i>Chlorostilbon lucidus</i> , <i>Eupetomena macroura</i> e <i>Heliomaster squamosus</i> em <i>Esterhazya splendida</i>	12

RESUMO

A produção de sementes por uma flor de angiosperma depende da quantidade e qualidade de pólen que alcança seu estigma. A qualidade do pólen que chega é influenciada por muitos fatores, tal como comportamento dos visitantes florais, disponibilidade de pólen na planta doadora, a estrutura do habitat e a distância que separa os indivíduos. A distância é associada às diferenças genéticas entre indivíduos sendo que os mais próximos são comumente mais semelhantes geneticamente, mas grande parte dos trabalhos que avaliou a influência da distância no sucesso reprodutivo até hoje tem sido feito em áreas temperadas ou em florestas tropicais. O conhecimento de como a distância de cruzamento influencia o sucesso reprodutivo de plantas ainda é limitado para as Savanas, que são ecossistemas importantes nos trópicos e subtrópicos. O objetivo desse estudo foi determinar se a distância de cruzamento entre os indivíduos afeta os componentes do sucesso reprodutivo de *Esterhazya splendida* Mikan. O estudo foi realizado em uma área de cerrado sentido restrito da reserva Ecológica do Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, MG. *Esterhazya splendida* (Orobanchaceae) é uma espécie autocompatível, polinizada principalmente por beija-flores. Caracterizamos a biologia floral, a densidade de indivíduos, a fenologia de floração e oferta de recursos. Realizamos tratamentos de polinizações controladas com fontes de pólen a distâncias que variaram de 0m (autopolinização) a 2000m e com as sementes produzidas realizamos um experimento de germinação. A espécie apresentou padrão de distribuição aleatório ($\chi^2=101,26$; $p>0,05$; $GL=99$) e uma densidade de 124 ind./ha. A oferta de néctar por área foi quantificada em 22,19 kcal/ha. O sucesso de formação de frutos da espécie não foi afetado pela distância dos cruzamentos. Apenas os frutos produzidos por autopolinização foram menores, mais leves e apresentaram menos sementes e as suas sementes apresentaram menor taxa de germinação, mas não houve diferença no tamanho das plântulas entre os tratamentos. *Eupetomena macroura* e *Amazilia sp.* foram vistos polinizando efetivamente as flores, sendo que *E. macroura* apresentou comportamento territorial. Os resultados indicam que a espécie pode apresentar depressão endogâmica. A presença de depressão endogâmica e ausência de efeito de distância em *E. splendida* implica em populações com heterogeneidade genética marcada. Seria interessante aplicar esse tipo de estudo a espécies endêmicas ou raras, já que tais espécies estão mais suscetíveis à extinção, pois ocorrem geralmente em populações pequenas, o que aumenta a expressão e fixação de alelos deletérios.

PALAVRAS CHAVE: Ornitofilia, depressão endogâmica, autocompatível, germinação, Cerrado.

ABSTRACT

The seed set of an angiosperm depends on the quality and quantity of pollen that reach its stigma. This is influenced by a number of factors, including behavior of the floral visitors, availability of pollen on the donor plant, the structure of the habitat between individuals, and the distance separating them. The distance can be associated to genetic differences between individuals, being closer individuals more related genetically. But much of the work that evaluated how distance affects the reproductive success until today has been done in temperate zones or in tropical forests. Although Savannas are an important ecosystem in the tropics and subtropics, we know little about how distance influence plant reproduction success in these systems. The aim of this study was to determine if the crossing distance affects the reproductive success components of *Esterhazya splendida* Mikan. The study was carried out at the Cerrado *sensu strictu* area of the Caça e Pesca Itororó Club, Uberlândia, MG. *Esterhazya splendida* (Orobanchaceae) is an autocompatible species, pollinated mainly by hummingbirds. We characterized its floral biology, individuals density, phenology and energy reward. We made pollination treatments with fonts of pollen ranging from 0m (self-pollination) to 2000m, and then we did a germination experiment. The species presented a random distribution ($\chi^2=101,26$; $p>0,05$; GL=99) and a density of 124 individuals per hectare. The nectar offer in the area was quantified in 22.19 kcal/ha. The fruit set was not affected by the distance from the pollen donor. The fruits from self-pollination were smaller, presented lower weight and less seeds and the seeds presented lower germination rate, but there was no difference in the seedlings length between treatments. *Eupetomena macroura* and *Amazilia sp.* effectively pollinated the flowers, and *E. macroura* presented a territorial behavior. The results indicate that *E. splendida* presents inbreeding depression but no outbreeding depression. The presence of inbreeding depression and absence of outbreeding depression implies in populations with high genetic heterogeneity. It would be interesting to apply this kind of study to endemic species or rare species given that they are more susceptible to extinction, because they occur generally in small populations, which increase the expression and fixation of deleterious alleles.

KEY-WORDS: Ornithophily, inbreeding depression, autocompatible, germination, Cerrado.

1. INTRODUÇÃO

A quantidade e a qualidade dos grãos de pólen que chegam ao estigma de uma planta podem afetar diretamente seu fitness influenciando o número, tamanho ou qualidade das sementes produzidas (WASER, N. M. ; PRICE, 1983; ZIMMERMAN; PYKE, 1988). Características reprodutivas e características ecológicas como fenologia, densidade e distribuição influenciam o comportamento dos polinizadores, que por sua vez afetam o fluxo de pólen entre indivíduos. (BARRETT, 2003; GHAZOUL, 2005)

Com o aumento do tamanho e da densidade da população, a atratividade se torna maior, aumentando consequentemente o número de visitas por planta(JENNERSTEN, 1988; POWELL; POWELL, 1987; SIH; BALTUS, 1987) e também a quantidade de pólen recebido por flor. Além da densidade, a capacidade de voo de um visitante floral pode afetar o fluxo gênico, pois tal capacidade determina a distância que o pólen pode ser disperso(BARRETT; HARDER, 1996). Além disso, estudos mostram que a distância entre os indivíduos pode influenciar a formação de frutos e sementes em plantas polinizadas por animais (BRYS; JACQUEMYN; HERMY, 2007; DUNCAN et al., 2004).

Em espécies polinizadas por animais encontra-se uma grande variedade de resultados: máximos de fitness na produção de frutos e sementes oriundos de cruzamentos com distâncias intermediárias(PRICE; WASER, 1979; SCHEMSKE; PAUTLER, 1984; WASER, N.M. ; PRICE, 1989; WASER, N. M.; PRICE, 1991), ou com o aumento da distância entre os parentais (DUDASH, 1990; LEVIN, D.A., 1984; LEVIN, D.A. , 1989). Há também exemplos de estudos que não conseguiram estabelecer qualquer relação entre a distância dos parentais e as características reprodutivas selecionadas(FENSTER, 1991; NEWPORT, 1989; SCHLICHTING; DEVLIN, 1992).

Os animais apresentam grande importância na reprodução das plantas nos trópicos, onde se estima que polinizem cerca de 98% das plantas (BAWA, 1990). Alguns trabalhos sugerem que o sucesso das Angiospermas pode ser atribuído à polinização biótica (CREPET, 1983; 1984; RAVEN, 1977; REGAL, P. J., 1977; REGAL, P.J., 1982). No entanto, apesar da savana ser o ecossistema dominante nos trópicos (BOURLIERE, 1983; HUNTLEY; WALKER, 1982), existem informações ainda limitadas acerca do fluxo de pólen e de como a distância afeta o sucesso reprodutivo das espécies vegetais desse tipo de ambiente (COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001). Grande parte dos estudos já realizados, que avaliaram o efeito da distância no sucesso reprodutivo das espécies, foram realizados em florestas tropicais ou em ambientes temperados (WARD et al., 2005). Isso é surpreendente, uma vez que as savanas apresentam grande biodiversidade e endemismos, e estão cada vez mais fragmentadas devido a expansão agrícola (MOREIRA; FERNANDES; COLLEVATTI, 2009) fazendo com que indivíduos e populações estejam cada vez mais isolados.

A distância entre os fragmentos pode interferir no fluxo gênico entre as populações uma vez que tal distância pode diminuir a deposição de pólen compatível no estigma da espécie devido à disponibilidade de indivíduos. Além disso, a fragmentação tende a reduzir a diversidade e abundância de polinizadores (AIZEN; FEINSINGER, 2002), reduzindo assim o fluxo gênico entre fragmentos e consequentemente a produção de frutos e sementes (AIZEN; FEINSINGER, 1994).

O Cerrado brasileiro é a maior savana da América do Sul, ocupando cerca de dois milhões de Km². Caracteriza-se pela grande diversidade de fisionomias vegetais, que abrigam alta diversidade de espécies vegetais sendo que pelo menos um terço é endêmico (MENDONÇA, 2008). Estudos apontam que grande parte dessas espécies dependem da interação com diversos grupos de animais polinizadores (OLIVEIRA; GIBBS,

2000; OLIVEIRA; GIBBS, 2002; SILBERBAUER-GOTTSBERGER; GOTTSBERGER, 1988) para sua reprodução.

Entre os grupos de polinizadores, os beija-flores constituem um dos grupos mais importantes de vertebrados(BAWA, 1990), sendo responsáveis pela polinização de cerca de 15% das espécies de plantas das comunidades na Região Neotropical (FEINSINGER, 1983; MORELATTO; SAZIMA, 1992). Já no cerrado, aparecem apenas como oportunistas ou polinizadores secundários de espécies lenhosas (OLIVEIRA; GIBBS, 2000), sendo importantes polinizadores do estrato herbáceo em áreas de cerrado aberto(BARBOSA; SAZIMA, 2008; SILBERBAUER-GOTTSBERGER; GOTTSBERGER, 1988). Muito comumente os beija-flores estão associados a espécies não tipicamente ornitófilas(MARUYAMA, 2011) e os recursos florais disponíveis para estas aves raramente permitem a manutenção de indivíduos residentes (ARAÚJO, F. P.; BARBOSA; OLIVEIRA, 2011).Tais evidências têm levado alguns pesquisadores a considerarem o Cerrado como ambientes marginais para beija-flores, quando comparados à áreas florestais (GOTTSBERGER; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 2006).

Mas, apesar das restrições de oferta de recursos, os beija-flores parecem ser polinizadores eficientes de muitas espécies de Cerrado. Eles são, por exemplo, polinizadores efetivos de *Palicourea rigida*, uma espécie distílica e autoincompatível, que apresenta flores especializadas para a polinização por beija-flores (MACHADO et al., 2010). Trabalhos sobre a biologia reprodutiva de espécies polinizadas por beija-flores no cerrado sugerem que o número de visitas, a distância de voo percorrida e a estratégia de forrageamento dos beija-flores podem afetar o fluxo de pólen entre os indivíduos promovendo o transporte de pólen a distâncias maiores que as utilizadas nos experimentos de polinizações manuais cruzadas (ARAÚJO, P. F.; OLIVEIRA, 1997).

No entanto, estudos acerca do efeito da distância de cruzamento no sucesso reprodutivo de espécies de ambiente de savanas tropicais ainda são escassos, sendo que os poucos que existem são relativos a espécies arbóreas(LACERDA et al., 2001; MELO JÚNIOR et al., 2004; PEREIRA, 2003; TELLES, M.P.C. et al., 2003; ZUCCHI et al., 2003) que em sua maioria são polinizadas por insetos(STACY et al., 1996).

Assim, o objetivo do trabalho foi determinar se a distância de cruzamento entre indivíduos afeta os componentes do sucesso reprodutivo de *Esterhazya splendida* Mikan. Mais especificamente, testar se a distância da fonte de pólen afeta o crescimento de tubos polínicos e fertilização, a produção de frutos e sementes, a germinação e o crescimento inicial de plântulas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de estudo

Realizamos o estudo entre os meses de maio e julho em uma área de cerrado *sensu stricto* da Reserva Particular do Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU), localizada nas coordenadas geográficas 18°30'-19°30' S a 47°50' -48°50' W (LIMA; ROSA; FELTRAN FILHO, 1989). A reserva do CCPIU apresenta 127 ha e encontra-se inserida dentro do Cerrado, um bioma que apresenta uma sazonalidade marcante com duas estações: uma mais fria e seca (maio a setembro), e outra quente e chuvosa (outubro a abril) (ROSA; LIMA; ASSUNÇÃO, 1991).

2.2. Espécie estudada

Esterhazya splendida Mikan é uma espécie da família Orobanchaceae, subarbustiva, que pode alcançar 2,5m de altura. Possui inflorescência do tipo cacho. As flores são tubulosas, zigomorfas, hermafroditas, nectaríferas, inodoras e vistosas em tons de vermelho e laranja, e apresentam duração de dois dias. As anteras de *Esterhazya splendida* são bem características, apresentam filamentos brancos, revolutos, desidratados e totalmente entrelaçados. É uma espécie autocompatível, polinizada principalmente por beija-flores(ORMOND; LIMA; et al., 1998; ORMOND; PINHEIRO; LIMA, 1998). Na área de estudo, as plantas se distribuem de maneira contínua na formação de cerrado (sentido restrito), mas, para o estudo, foram consideradas como duas populações: População 1 ocorrendo em áreas mais perturbadas numa das extremidades da reserva e a População 2 ocorrendo cerca de 2km de distância numa área menos perturbada (Fig. 1). Atualmente as duas áreas não apresentam grandes diferenças fisionômicas, nem barreiras que caracterizem as plantas como populações no sentido estrito.

2.3. Delineamento experimental

2.3.1. Densidade de plantas, fenologia da floração e oferta de recursos

Caracterizamos a densidade de plantas em flor e a fenologia de floração estabelecendo e percorrendo 20 transectos paralelos de 5x100m, distantes pelo menos 20m entre si a um intervalo de 15 dias no pico de floração da espécie. Este estudo já havia sido realizado entre entre maio de 2008 e julho de 2009. Coletamos os dados de floração nesses transectos, totalizando uma área de um hectare. Em cada amostragem, anotamos o número de indivíduos floridos e o número de flores por indivíduo. Calculamos a densidade de plantas, estimamos a oferta de recursos florais e estimamos ainda o padrão de distribuição de recursos na área utilizando o índice de dispersão(MARUYAMA, 2011), sendo que estes dados foram coletados apenas para a população 2.

2.3.2. Tratamentos de polinizações controladas

Para examinar o efeito da distância da fonte de pólen no sucesso reprodutivo de *E. splendida*, utilizamos duas manchas de indivíduos distantes 2km entre si(Figura 1). Selecionamos cinco indivíduos por mancha e em cada indivíduo cinco inflorescências foram utilizadas para que o delineamento experimental fosse aplicado. Adotamos o delineamento experimental de blocos ao acaso. Cada bloco era constituído de quatro tratamentos de polinização diferentes: autopolinização (0m), doadores de pólen distantes 50 metros, 250 metros e 2 km. Realizamos o experimento de polinizações controladas nas duas manchas de *E. splendida*. Foram feitas 25 polinizações de cada tratamento por mancha. Para cada tratamento, avaliamos a taxa de formação de frutos, e outros aspectos do sucesso reprodutivo conforme descrito abaixo.



Figura 1. Imagem aérea da reserva do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia. Em asterisco, as duas manchas de indivíduos de *Esterhazyia splendida* utilizadas para o estudo.

2.3.3. Crescimento do tubo polínico e fertilização

Para a observação do crescimento dos tubos polínicos e fertilização, coletamos flores submetidas aos quatro tratamentos (autopolinização, 50m, 250m e 2 km), 24, 48 e 72 horas após a polinização e as fixamos em álcool 70%. Os pistilos foram preparados e observados em microscopia de fluorescência (MARTIN, 1959). As observações foram realizadas utilizando microscópio Zeiss Axioscope e documentadas utilizando uma câmera digital Olympus DP70 acoplada ao microscópio.

2.3.4. Experimento de germinação

Realizamos os testes de germinação com sementes obtidas dos diferentes tratamentos de polinizações controladas. Semeamos as sementes sobre papel filtro umedecido e as mantivemos em câmaras úmidas (câmaras de Emanueli, patente requerida junto ao INPI nº 014050001201), contendo 30 ml de água destilada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (SANTANA; RANAL, 2000). Foram feitas quatro repetições contendo 50 sementes cada uma se o fruto apresentasse 200 sementes, duas repetições com 50 sementes cada uma se o fruto apresentasse pelo menos 100 sementes, uma repetição com 50 sementes se o fruto apresentasse pelo menos 50 sementes e uma repetição com todas as

sementes do fruto caso o mesmo apresentasse menos de 50 sementes. Instalamos o experimento em câmara de germinação (Seedburo Equipment Company, modelo MPG-2000) sob luz branca fluorescente contínua, com irradiância próxima de $13\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a uma temperatura de 25°C. As observações foram feitas a cada 24 horas e o critério de germinação adotado foi a projeção da raiz primária. Dois meses após a germinação, medimos o comprimento total e altura do hipocôtilo das plântulas formadas.

2.3.5. Visitantes florais

Registraramos os visitantes florais de 07h00min até 18h00min. Foram realizadas 30 horas de observação focal. Durante as observações foram registradas as espécies de beija-flor visitantes, o horário e a duração da visita, o número de flores visitadas, a ocorrência de comportamento territorial e de possíveis encontros agonísticos com outros beija-flores ou visitantes de outros grupos. Identificamos os beija-flores diretamente no campo com o auxílio de binóculo, e também através de fotos juntamente com auxílio de guias de campo (SIGRIST, 2007).

3. Análises estatísticas

Para determinar se haviam diferenças no sucesso de frutificação, no comprimento e largura dos frutos, peso dos frutos, número de sementes por fruto, taxa de germinação e tamanho das plântulas formadas a partir de pólen de distâncias diferentes, foi realizado uma Análise de Variância (Anova) em bloco. O bloco foi formado pelos indivíduos estudados, pois pode haver uma variação biológica entre eles. Nos casos em que foi encontrada diferença entre os tratamentos foi realizado uma comparação post-hoc através do teste de Tukey para se determinar quais tratamentos diferiam. Todas as análises estatísticas do estudo foram feitas através do programa Systat 10.2 (SPSS 2000).

RESULTADOS

3.1. Densidade, fenologia da floração e oferta de recursos

Os primeiros botões começaram a aparecer no final do mês de abril e o pico de floração ocorreu entre os meses de junho e julho nos transectos.

A espécie apresentou um padrão de distribuição aleatório ($\chi^2=101,26$; $p>0,05$; GL=99) com uma densidade de 124 indivíduos por hectare. Na área em que foram realizados os transectos, foram contabilizadas 710 flores em todos os transectos, sendo que a oferta de recursos diária para a espécie foi estimada em 22,19kcal/ha.

3.2. Polinizações controladas, crescimento do tubo polínico e fertilização, germinação

O experimento de polinizações controladas mostrou que não houve diferença na taxa de formação de frutos entre os tratamentos de polinizações de distâncias diferentes ($F = 0,231$, $p=0,874$) sendo alta para todos eles (Figura 2). Houve diferença na taxa de formação de frutos apenas entre os indivíduos ($F=7,615$, $p<0,01$).

Os frutos provenientes do tratamento de autopolinização manual são duas vezes menores (comprimento: $F=5,100$, $p<0,01$; largura: $F=4,424$, $p<0,01$), tem menor peso ($F=4,900$, $p<0,01$) e apresentam dez vezes menos sementes que os frutos provenientes dos outros tratamentos ($F= 37,291$, $p<0,01$; Tabela 2). A germinação (Figura 7) ocorreu 15 dias após a semeadura. As sementes de autopolinização apresentaram menor taxa de germinação ($F=14,559$, $p<0,01$), entretanto, não houve diferença no tamanho total das plântulas e na altura do hipocôtilo (Figura 8) entre os tratamentos($F=0,933$, $p=0,924$; $F=0,703$, $p=0,551$, respectivamente; Tabela 3).

Tabela 1. Comprimento, largura e peso dos frutos e número de sementes provenientes dos tratamentos de autopolinização manual, 50m, 250m e 2km. (n=50). (*Peso dos frutos + sementes). Letras diferentes representam diferenças significativas. Os valores representam a média (\pm desvio padrão).

	Autopolinização	50m	250m	2km	F; p
Comprimento	4.280±1.611 ^a	9.088±2.088 ^b	8.777±2.306 ^b	8.984±1.943 ^b	F= 5,1; p<0,01
Largura	6.115±1.280 ^a	6.266±1.242 ^b	6.03±1.304 ^b	6.115±1.280 ^b	F=4,424;p<0,01
Peso*	0.0268±0.068 ^a	0.1013±0.113 ^b	0.0837±0.08 ^b	0.0797±0.03 ^b	F=4,9;p<0,01
Número de sementes	80,42±127,5 ^a	814,9±352,3 ^b	650,1±313,8 ^b	808,5±432,7 ^b	F=37.29;p<0,01

Tabela 2. Proporção de germinação, tamanho das plântulas e altura do hipocôtilo dos tratamentos de autopolinização manual, 50m, 250m e 2km. Entre parênteses são apresentados o número de frutos formados/flores tratadas ou o tamanho das amostras de sementes e plântulas analisadas. Letras diferentes representam diferenças significativas. Os valores representam a média (\pm desvio padrão).

	Autopolinização	50m	250m	2km	F; p
Formação de frutos	90%(45/50)	92%(46/50)	92%(46/50)	90%(45/50)	F =0,231;p=0,874
Proporção	0,1786±0,299 ^a	0,5806±0,317 ^b	0,5960±0,325 ^b	0,5713±0,34 ^b	F=20,4; p<0,01
Germinação	(n=463)	(n=5668)	(n=5070)	(n=5761)	
Tamanho das plântulas	17,22±7,948 (n=25)	19,55±7,06 (n=270)	19,61±6,62 (n=210)	19,69±6,84 (n=249)	F=0,933;p=0,424
Altura do hipocôtilo	3,79±1,458 (n=25)	3,74±1,51 (n=270)	3,90±1,40 (n=210)	3,83±1,44 (n=249)	F=0,703;p=0,551

Os tubos polínicos dos tratamentos de autopolinização parecem crescer mais lentamente quando comprados aos dos outros tratamentos, além de haver menos tubos em crescimento. Entretanto, não conseguimos observar tubos polínicos chegando aos óvulos nas flores coletadas 48 e 72 horas após o tratamento de autopolinização manual (Figura 9). Já para os tratamentos de 50m (Figura 10), 250m(Figura 11) e 2km foi possível observar vários tubos polínicos chegando aos óvulos a partir de 48 horas após realizadas as polinizações.

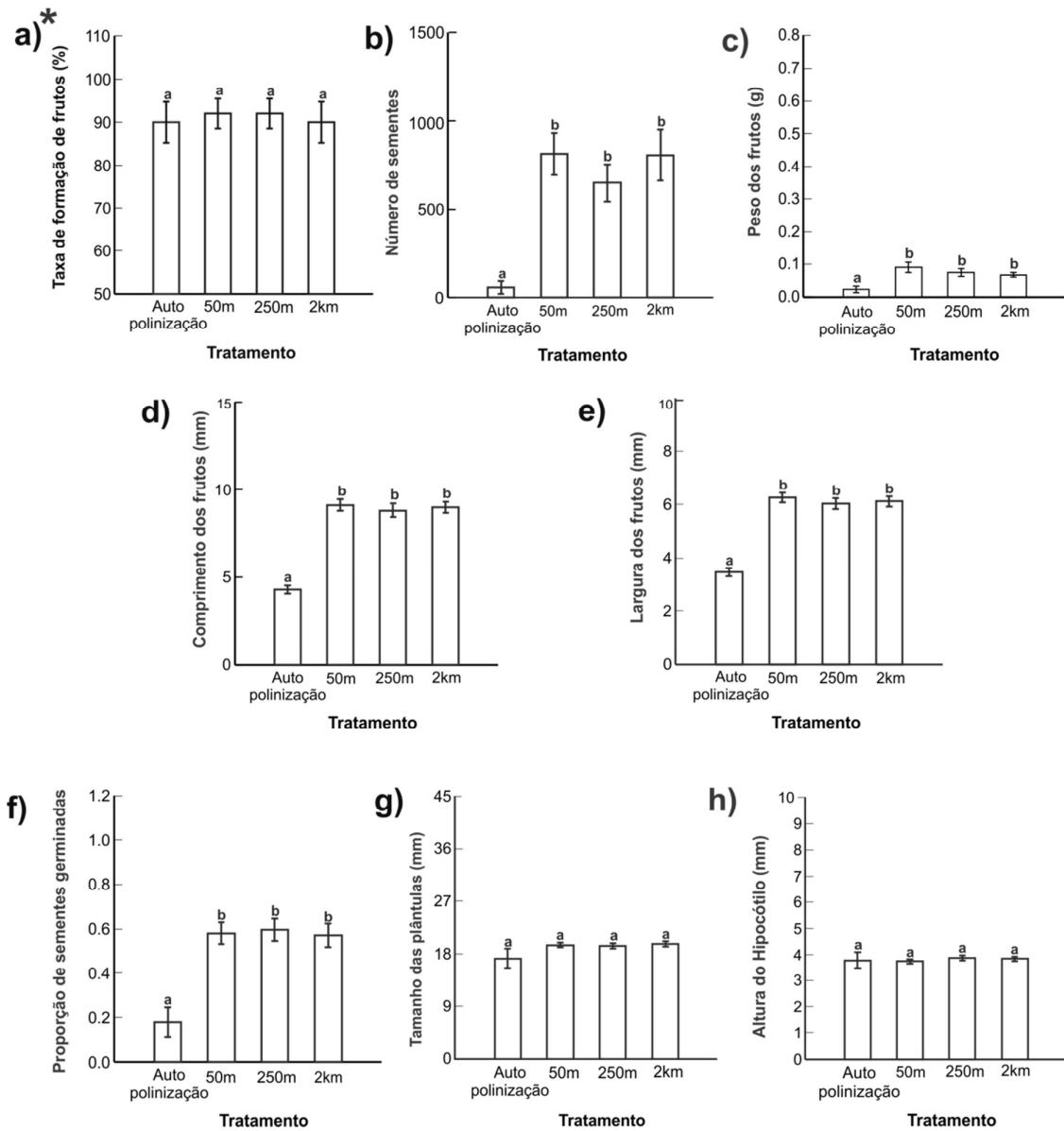


Figura 2. Efeito da distância de cruzamento na taxa de formação de frutos (%) (a), produção de sementes (b), Peso do fruto (c), comprimento (d) e largura do fruto (e), na germinação (f), no tamanho das plântulas (g) e na altura do hipocôtilo (h) de *E. splendida*. O estudo foi realizado entre maio e julho de 2010 na reserva do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, MG. Letras diferentes representam diferenças significativas. Os valores representam a média (\pm desvio padrão) por tratamento. (*barras indicam erro padrão)

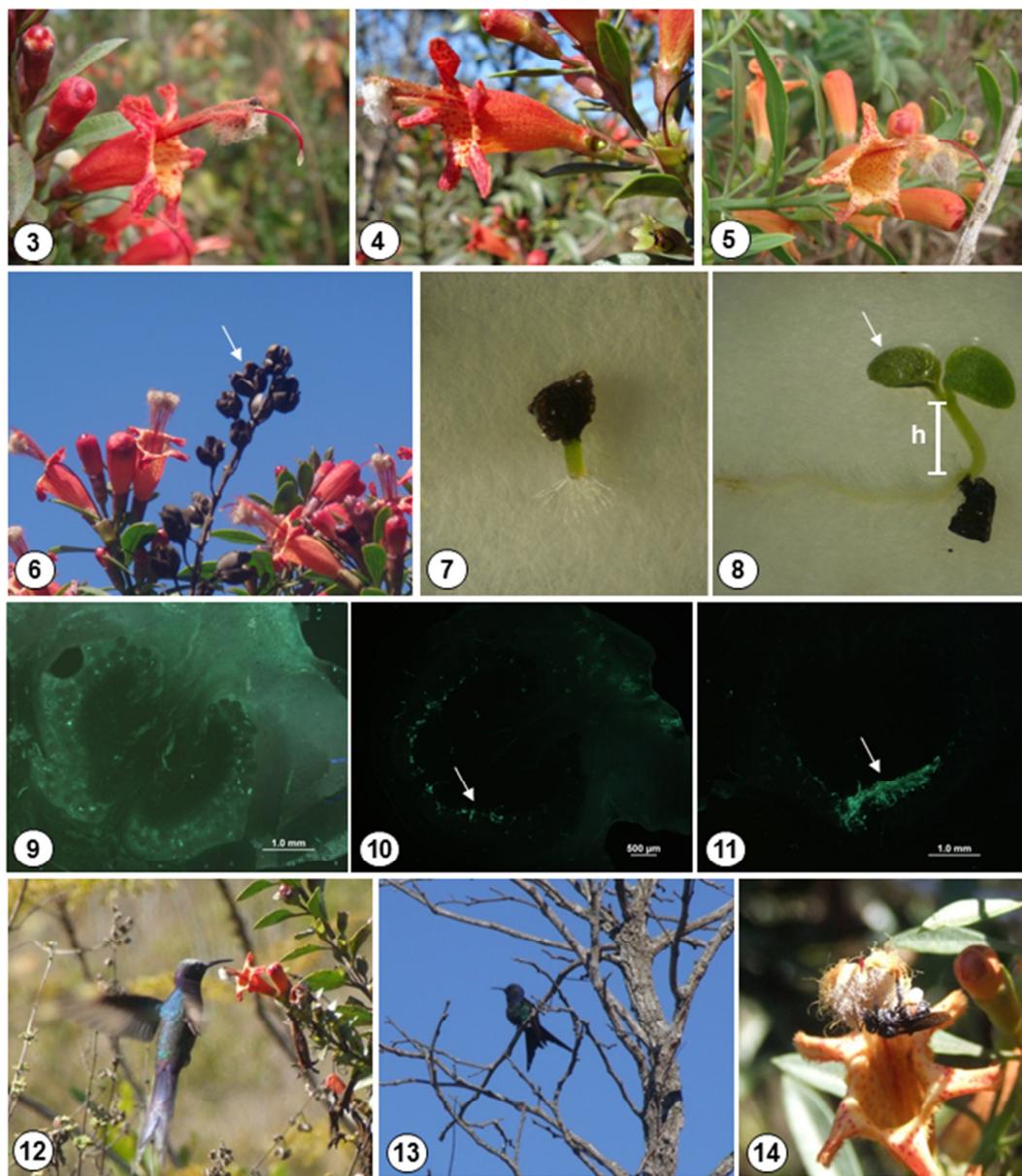
3.3. Visitantes florais

Os beija-flores foram os principais visitantes florais e polinizadores de *E. splendida*, sendo que *Amazilia* sp. foi a espécie mais frequente (50% das visitas) (Tabela 1). O beija-flor

visitava as flores de uma maneira sistemática, semelhante ao comportamento de rotas de forrageamento apresentado comumente por beija-flores trapliners. Diferente de *Amazilia*, *Eupetomena macroura* (Figura 12), apresentou comportamento aparentemente territorial, pois ficava empoleirado em galhos próximos aos indivíduos de *E. splendida* em floração (Figura 13) (geralmente vocalizando), realizava visitas às flores e voltava para o mesmo local que estava antes. Durante esses momentos em que ficava nos galhos, apresentou também comportamento agonístico com outros beija-flores que tentavam visitar as flores. Borboletas *Phoebis sennae*, (Pieridae) também visitaram as flores de *Esterhazyia splendida*, e em algumas vezes *E. macroura* apresentou comportamento agressivo com o inseto, o expulsando do local. Comportamentos agonísticos de *E. macroura* também foram registrados com outras aves, como como o saíra-amarela (*Tangara cayana*), que pousou em um dos indivíduos para se alimentar de insetos. Mas algumas abelhas do gênero *Trigona* foram observadas pilhando pólen e néctar sem serem importunadas. (Figura 14). *Heliomaster squamosus* apresentou comportamento territorial semelhante a *E. macroura* enquanto que *Chlorostilbon lucidus* apresentou comportamento semelhante a *Amazilia* sp.

Tabela 3. Número de visitas, número de flores e duração das visitas realizadas por *Amazilia* sp., *Chlorostilbon lucidus*, *Eupetomena macroura* e *Heliomaster squamosus* em *Esterhazyia splendida*.

Espécie	Número de visitas	Número de flores	Duração da visita(s)
<i>Amazilia</i> sp.	50	9,48±8,44	25,151±25,40
<i>Chlorostilbon lucidus</i>	12	8,75±7,09	45,954±50,52
<i>Eupetomena macroura</i>	23	11,043±7,66	24,331±18,51
<i>Heliomaster squamosus</i>	15	10,733±8,77	22,92±15,62



Figuras 3-14. Morfologia floral e reprodução de *E. splendida*. 3, 4 e 5. Diferentes tonalidades das flores variando desde o vermelho intenso até o laranja. 6. Seta indica frutos maduros de *E. splendida*. 7. Protrusão da radícula. 8. Plântula de *E. splendida* (seta indica cotilédone; letra h indica hipocôtilo). 9. Corte transversal do ovário de flor 48 horas após receber o tratamento de autopolinização - não há tubos polínicos alcançando os óvulos. 10. Corte transversal do ovário de flor 48 horas após receber o pólen de 50 metros de distância (seta indica tubos polínicos). 11. Corte transversal do ovário de flor 48 horas após receber o pólen de 250 metros de distância (seta indica tubos polínicos). 12. *Eupetomena macroura* visitando flor de *E. splendida*. 13. *E. macroura* apresentando comportamento territorial. 14. Abelha do gênero *Trigona* pilhando pólen.

4. DISCUSSÃO

O sucesso reprodutivo de *Esterhazya splendida* não foi afetado pela distância dos cruzamentos. Apenas os frutos produzidos por autopolinização foram menores, mais leves e apresentaram menos sementes. Tais resultados indicam que a espécie apresenta depressão endogâmica, que é a redução na produção de frutos e sementes e no fitness da progênie, comumente devido ao aumento da homozigose e da expressão de genes alelos recessivos deletérios por causa da autopolinização(CHARLESWORTH; CHARLESWORTH, 1987; LANDE, 1995; TRAME; CODDINGTON; PAIGE, 1995; WASER, N.M.; WILLAMS, 2001). Apesar do efeito negativo da autopolinização no tamanho e peso dos frutos e no número de sementes por fruto, não houve tal efeito sobre o tamanho das plântulas e altura do hipocôtilo.(SHIELDS, 1982)sugere em seu estudo que os efeitos da depressão endogâmica se manifestam principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento. Isso pode explicar o fato das sementes de *E. splendida* formadas a partir dos tratamentos de autopolinização terem seu desenvolvimento menos afetado e conseguirem gerar plântulas de mesmo vigor que os outros tratamentos.

Estudos realizados com *E. splendida* em ambiente de restinga também mostraram que frutos provenientes de autopolinização são menores e possuem menos sementes quando comparados com aqueles provenientes de polinizações cruzadas. O estudo sugere que a qualidade da progênie pode ser influenciada pela distância do estigma (área receptora dos grãos de pólen) e do emaranhado de filamentos que unem as quatro anteras. Quanto mais próximas essas duas áreas estiverem durante a visita do polinizador, maior será o número de autopolinizações, e quanto mais distante elas estiverem, maior será o número de polinizações cruzadas. Flores com distâncias menores entre o estigma e as anteras podem servir como uma “válvula de escape” para caso haja ausência de polinizadores, uma vez que há produção de frutos e sementes a partir de autopolinizações espontâneas (ORMOND; LIMA; et al., 1998).

No entanto, estudos com outras espécies ornitófilas em ambientes temperados mostram uma distância ótima de cruzamento, com maior produção de sementes por fruto a distâncias intermediárias (1 a 100 metros) (PRICE; WASER, 1979). Diferente de *E. splendida*, a estas plantas apresentaram, além de depressão endogâmica, depressão alogâmica como resultado de cruzamentos a distâncias maiores que 100 metros. Alguns autores sugerem que a distância ótima de cruzamento pode ser um evento raro que se aplica somente às espécies com dispersão gênica restrita ou a espécies que são adaptadas a um ambiente marcadamente heterogêneo (BROYLES; WYATT, 1991). A presença de depressão endogâmica e ausência de efeito de distância em *E. splendida* implica em populações com heterogeneidade genética marcada. O fato das sementes de *E. splendida* não apresentarem estruturas especializadas para a dispersão pelo vento nos faz acreditar que a heterogeneidade é mantida pelo fluxo de pólen realizado pelos polinizadores. Então, apesar de autocompatível, o fluxo de pólen é suficiente para manter heterogeneidade genética e evitar problemas de endogamia nos cruzamentos a pequenas distâncias. Mesmo quando as distâncias dos cruzamentos foram ainda menores que no experimento atual, cruzamentos entre plantas vizinhas, não houve evidência de depressão endogâmica (Ferreira *et al.*, dados não publicados).

Estudos acerca da estrutura genética e tamanho populacional das espécies vegetais de áreas de cerrado ainda são recentes (MARTINS *et al.*, 2006). Tais estudos mostram que as populações vegetais do cerrado apresentam uma alta variabilidade genética, o que normalmente é esperado para árvores tropicais (LACERDA *et al.*, 2001). Os trabalhos realizados com *Caryocar brasiliense* (COLLEVATTI *et al.*, 2001), *Eugenia dysenterica* (TELLES, M.P.C. *et al.*, 2003; ZUCCHI *et al.*, 2003) *Anona crassiflora* (TELLES, M.P.C. *et al.*, 2003) e *Plathymenia reticulata* (LACERDA *et al.*, 2001) demonstraram que há uma limitação do fluxo gênico a longas distâncias, chegando a 120km para *Eugenia dysenterica*,

uma distância bem maior que a utilizada neste estudo com *E. splendida*. Embora as taxas de cruzamento sejam elevadas nas espécies *C. brasiliense*(COLLEVATTI et al., 2001) e em *E. dysenterica* (TELLES, M.P.C. et al., 2003) o cruzamento entre parentes e o número restrito de doadores de pólen participando dos cruzamentos são fontes significativas de endogamia. Estudos realizados com espécies ornitófilas em outros ambientes tropicais(ALDRICH; HAMRICK, 1998; DEGEN; BANDOU; CARON, 2004) mostram que indivíduos próximos são mais parentados, e que pares de indivíduos distantes entre 300 e 500m são mais diferentes do que era esperado. De qualquer forma, estas semelhanças podem não ser suficientes para gerar problemas de endogamia nos cruzamentos entre indivíduos próximos.

E. splendida apresenta distribuição aleatória na população 2, mas outros estudos na mesma área indicaram distribuição agrupada(MARUYAMA, 2011). A forma de crescimento com rebrotamento e o número alto de flores por indivíduo provavelmente faz com que os recursos florais tenham distribuição em manchas. Este tipo de distribuição de recursos provavelmente estimula o comportamento territorial em *E. macroura* e em *Heliomaster squamosus*. Mas, apesar da distribuição agrupada e do comportamento territorial dos polinizadores, *Esterhazya splendida* apresenta taxas de formação de frutos por polinização natural semelhantes aos obtidos por polinização cruzada manual (Ferreira et al., dados não publicados). Isso mostra que as populações estudadas apresentam uma heterogeneidade genética suficiente para impedir que haja endogamia devido a cruzamentos com indivíduos próximos, mas uma heterogeneidade não tão marcada ao ponto de promover uma depressão por alogamia.

O comportamento territorial de *Eupetomena macroura* e de *H. squamosus* ao visitar as flores de *E. splendida*, provavelmente deve resultar muito mais em autopolinizações ou polinização entre flores de um mesmo indivíduo do que em polinizações cruzadas. No entanto, estudos realizados com outras espécies polinizadas por esses beija-flores (JUSTINO;

MARUYAMA ; OLIVEIRA, 2012; MACHADO et al., 2010), mostram que, no final das contas, não há um efeito negativo sobre o sucesso reprodutivo da espécie apesar do comportamento territorial apresentado por essas aves. Tal comportamento de territorialidade pode fazer com que os outros beija-flores que expulsos das manchas protegidas por *E. macroura*, tenham que buscar indivíduos em floração em locais mais distantes, fazendo com que haja uma dispersão do pólen a maiores distâncias e uma consequente maior heterogeneidade genética das populações. Trabalhos realizados com outras espécies ornitófilas sugerem que os beija-flores podem trazer pólen de distâncias maiores promovendo uma maior variabilidade genética e uma consequente melhor qualidade de frutos e sementes (Araújo & Oliveira 1997).

A fragmentação pode afetar a densidade da população de polinizadores, os padrões de comportamento e forrageamento dos mesmos(GILPIN; SOULÉ, 1986; LEVINS, 1970; MACARTHUR; WILSON, 1967; PULLIAM, 1988; SHAFFER, 1981), podendo resultar em um maior número de autopolinizações que polinizações cruzadas quando comparado com áreas naturais, uma vez que as populações se tornam bem menores que o tamanho original permitindo um número maior de revisitas(AIZEN; FEINSINGER, 2002). Neste caso, em um cenário de fragmentação, *Esterhazyia splendida* mesmo apresentando depressão endogâmica conseguiria formar frutos e sementes; mas, no entanto, em longo prazo isso poderia vir a se tornar um problema já que com o aumento de autopolinizações também haveria um consequente acúmulo de alelos recessivos, diminuindo a qualidade da progênie.

Seria interessante aplicar tal tipo de estudo a espécies endêmicas ou raras, uma vez que tais espécies estão mais suscetíveis à extinção. Elas ocorrem geralmente em populações pequenas, o que as tornam mais vulneráveis à extinção devido à expressão e fixação de alelos deletérios (risco genético de extinção) e a fatores demográficos, como a fragmentação (risco ecológico de extinção) (LANDE, 1995). Outro aspecto importante seria fazer um estudo em

longo prazo com as plântulas dessas espécies, acompanhando seu desenvolvimento após alguns anos.

Trabalhos como esse permitem avaliar o efeito e as consequências das alterações no ambiente sobre o sucesso reprodutivo das espécies vegetais. No entanto, os métodos tradicionais de estudo do sistema de reprodução de uma espécie, que são baseados na análise da morfologia floral, em experimentos de cruzamentos e na observação do comportamento dos polinizadores, fornecem apenas informações qualitativas (CLEGG, 1980), além de serem realizados, na maioria das vezes, em apenas uma população. A inferência quantitativa do sistema de reprodução é possível pelo uso de marcadores moleculares (JAMES et al., 1998), o que possibilita se quantificar geneticamente os resultados dos cruzamentos (CLEGG, 1980).

O conhecimento de todos os aspectos do sistema de reprodução de uma espécie é necessário para entender a distribuição da variação genética entre indivíduos e os padrões de fluxo gênico entre e dentro de populações. Com essas informações é possível avaliar o efeito da ação humana sobre esses processos e estabelecer as estratégias mais adequadas para a conservação e o uso da variação genética(BOSHIER, 2000).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZEN, A. M.; FEINSINGER, P. Forest Fragmentation , Pollination , and Plant Reproduction in a Chaco Dry Forest , Argentina. **Ecological Society of America** v. 75, p. 330-351, 1994.

AIZEN, A. M.; FEINSINGER, P. Bees Not to Be? Responses of Insect Pollinator Faunas and Flower Pollination to Habitat Fragmentation. **Ecological Studies** v. 162, p. 112-129, 2002.

ALDRICH, P. R.; HAMRICK, J. L. Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical forest mosaic. **Science**, v. 281, p. 103-105, 1998.

ARAÚJO, F. P.; BARBOSA, A. A. A.; OLIVEIRA, P. E. Floral resources and hummingbirds on an island of flooded forest in Central Brazil. **Flora**, v. 206, p. 827-835, 2011.

ARAÚJO, P. F.; OLIVEIRA, P. E. Biologia floral de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) e mecanismos para evitar a autopolinização. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, p. 61-70, 1997.

BARBOSA, A. A. A.; SAZIMA, M. Biologia reprodutiva de plantas herbáceo-arbustivas de uma área de campo sujo de cerrado. In: (Ed.). **Cerrado: Ecologia e Flora**. Brasilia/DF, v.1, 2008. p.291-307.

BARRETT, S. C. H. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 358, p. 991-1004, 2003.

BARRETT, S. C. H.; HARDER, L. D. Ecology and evolution of plant mating. **Trends Ecol. Evol.** , v. 11, p. 73-79, 1996.

BAWA, K. S. Plant-Pollinator Interactions in Tropical Rain Forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 21, p. 399-422, 1990.

BOSHIER, D. H. Mating Systems. In: (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**: Collingwood: CSIRO publishing 2000. cap. 5, p.63-79.

BOURLIERE, F. **Tropical savannas. Ecosystems of the World**. New York: Elsevier, 1983.

BROYLES, S. B.; WYATT, R. Effective Pollen Dispersal in a Natural Population of *Asclepias exaltata* : The Influence of pollinator behaviour, genetic similarity, and mating success. **The American Naturalist**, v. 138, p. 1239-1249, 1991.

BRYS, R.; JACQUEMYN, H.; HERMY, M. Impact of mate availability, population size, and spatial aggregation of morphs on sexual reproduction in a distylous plant. **American Journal of Botany**, v. 94, p. 119-127, 2007.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v. 18, p. 237-268, 1987.

CLEGG, M. T. Measuring plant mating systems. *BioScience*, v. 30, p. 814-818, 1980.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Mol. Ecol.*, v. 10, p. 349-356, 2001.

CREPET, W. L. The role of insect pollination in the evolution of the angiosperms. In: (Ed.). **Pollination Biology**. Orlando, FL: Academic Press, 1983. p.29-50.

CREPET, W. L. Advanced (constant) insect pollination mechanisms: pattern of evolution and implications vis-a-vis angiosperm diversity. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, v. 71, p. 607-630, 1984.

DEGEN, B.; BANDOU, E.; CARON, H. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Sympomia globulifera* in French Guiana. *Heredity*, v. 93, p. 585-591, 2004.

DUDASH, M. R. Relative fitness of selfed and outcrossed progeny in a self-compatible, protandrous species, *Sabatia angularis* L. (Gentianaceae): a comparison in three environments. *Evolution*, v. 44, p. 1129-1139, 1990.

DUNCAN, D. H. et al. Plant isolation reduces outcross pollen receipt in a partially self-compatible herb. *Journal of Ecology*, v. 92, p. 977-985, 2004.

FEINSINGER, P. Coevolution and pollination. In: (Ed.). **Coevolution**. Sunderland, 1983. p.282-310.

FENSTER, C. B. Effect of male pollen donor and female seed parent on allocation of resources to developing seeds and fruit in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, v. 78, p. 13-23, 1991.

GHAZOUL, J. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. *Biological Reviews*, v. 80, p. 413-443, 2005.

GILPIN, M. E.; SOULÉ, M. E. Minimum viable populations: processes of species extinctions. In: SOULÉ, M. E. (Ed.). **Conservation biology: the science of scarcity and diversity**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 1986. p.11-34.

GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. **Life in the Cerrado: a South American Tropical Seasonal Vegetation**. Ulm: Reta Verlag, 2006.

HUNTLEY, B. J.; WALKER, B. H. **Ecology of tropical savannas**. Berlin: Springer, 1982. 669

JAMES, T. et al. Mating system of three tropical dry forest tree species. **Biotropica**, v. 30, p. 587-594, 1998.

JENNERSTEN, O. Pollination in *Dianthus deltoides* (Caryophyllaceae): effects of habitat fragmentation on visitation and seed set. **Conservation Biology**, v. 2, p. 359-366, 1988.

JUSTINO, D. G.; MARUYAMA , P. K.; OLIVEIRA, P. E. Floral resource availability and hummingbird territorial behaviour on a Neotropical savanna shrub. **Journal of Ornithology**, v. 153, p. 189-197, 2012.

LACERDA, D. R. et al. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 1143-1152, 2001.

LANDE, R. Mutation and conservation. **Conserv. Biol**, v. 9, p. 782-791, 1995.

LEVIN, D. A. Inbreeding depression and proximity-dependent crossing success in *Phlox drummondii*. **Evolution**, v. 38, p. 116-127, 1984.

LEVIN, D. A. Proximity-dependent cross-compatibility in *Phlox*. **Evolution**, v. 43, p. 1114-1116, 1989.

LEVINS, R. Extinction. In: HABER, M. G.-. (Ed.). **Some mathematical questions in biology**. Rhode Island, USA., v.II, 1970. p.75-108.

LIMA, S. C.; ROSA, R.; FELTRAN FILHO, A. Mapeamento do uso do solo no município de Uberlândia-MG, através de imagens Tm/Landsat. **Sociedade e Natureza**, v. 1, p. 127-145, 1989.

MACARTHUR, R. H.; WILSON, E. O. **The theory of island biogeography**. New Jersey, USA: Princeton University Press, 1967.

MACHADO, A. O. et al. Breeding biology and distyly in *Palicourea rigida* H. B. & K. (Rubiaceae) in the Cerrados of Central Brazil. **Acta bot. bras.**, v. 24, p. 686-696, 2010.

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

MARTINS, K. et al. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, v. 7, p. 957-969, 2006.

MARUYAMA, P. K. **Disponibilidade de recursos florais e o seu uso por beija-flores em uma área de cerrado de Uberlândia, MG.** 2011. 56 (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

MELO JÚNIOR, A. F. et al. Estrutura genética em populações naturais de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia forestalis**, v. 66, p. 56-65, 2004.

MOREIRA, P. A.; FERNANDES, G. W.; COLLEVATTI, R. G. Fragmentation and spatial genetic structure in *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) a seasonally dry Neotropical tree. **Forest Ecology and Management**, v. 258, p. 2690-2695, 2009.

MORELATTO, L. P. C.; SAZIMA, M. Modos de polinização em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil (Reserva de Santa Genebra, Campinas, SP). In: (Ed.). **SEMINARIO: MATA DE SANTA GENEBA: CONSERVAÇÃO E PESQUISA EM UMA RESERVA FLORESTAL URBANA**, Campinas, 1992. p.13.

NEWPORT, M. E. A. A test for proximity-dependent outcrossing in the alpine skypilot, *Polemonium viscosum*. **Evolution**, v. 43, p. 1110-1113, 1989.

OLIVEIRA, P. E.; GIBBS, P. E. Reproductive biology of woody plants in a cerrado community of Central Brazil. **Flora**, v. 195, p. 311-329, 2000.

OLIVEIRA, P. E.; GIBBS, P. E. Pollination and reproductive biology in cerrado plant communities. In: (Ed.). **The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical Savanna**. New York: Columbia University Press, 2002. p.329-347.

ORMOND, W. T. et al. Biologia floral e da reprodução de *Esterhazya splendida* Mikan (Scrophulariaceae). **Boletim do Museu Nacional**, v. 105, p. 1-12, 1998.

ORMOND, W. T.; PINHEIRO, M. A.; LIMA, H. A. Importância dos filamentos das anteras na polinização de *Esterhazya splendida* Mikan (Scrophulariaceae). **Boletim do Museu Nacional**, v. 102, p. 1-11, 1998.

PEREIRA, M. D. F. **Estrutura genética de populações de espécies arbóreas nativas do cerrado encontradas em terrenos serpentínicos.** 2003. 76 (Mestrado). Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

POWELL, A. H.; POWELL, G. V. N. Population dynamics of male euglossine bees in Amazonian forest fragments. **Biotropica**, v. 19, p. 176-179, 1987.

PRICE, M. V.; WASER, N. M. Pollen dispersal and optimal outcrossing in *Delphinium nelsonii*. **Nature**, v. 277, p. 294-297, 1979.

PULLIAM, H. R. Sources, sinks, and population regulation. **American Naturalist**, v. 132, p. 652-661, 1988.

RAVEN, P. H. A suggestion concerning the Cretaceous rise to dominance of the angiosperms. **Evolution**, v. 31, p. 451-452, 1977.

REGAL, P. J. Ecology and evolution of flowering plant dominance. **Science**, v. 196, p. 622-629, 1977.

REGAL, P. J. Pollination by Wind and Animals: Ecology of Geographic Patterns. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 13, p. 497-524, 1982.

ROSA, R.; LIMA, S. C.; ASSUNÇÃO, W. L. Abordagem preliminar das condições climáticas de Uberlândia (MG). **Sociedade e Natureza**, v. 3, p. 91-108, 1991.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. Análise Estatística na Germinação. **R. Bras.Fisiol.Veg**, v. 12, p. 205-237, 2000.

SCHEMSKE, D. W.; PAUTLER, L. P. The effects of pollen composition on fitness components in a neotropical herb. **Oecologia**, v. 62, p. 31-36, 1984.

SCHLICHTING, C. D.; DEVLIN, B. Pollen and ovule sources affect seed production of *Lobelia cardinalis* (Lobeliaceae). **American Journal of Botany**, v. 79, p. 891-898, 1992.

SHAFFER, M. L. Minimum population sizes for species conservation. **BioScience**, v. 31, p. 131-134, 1981.

SHIELDS, W. M. **Philopatry, inbreeding and the evolution of sex**. NY Press, 1982.

SIGRIST, T. **Guia de Campo - Aves do Brasil Oriental**. São Paulo, SP: Editora AvisBrasilis, 2007. 448

SIH, A.; BALTUS, M. Patch size, pollinator behavior, and pollinator limitation in catnip. **Ecology**, v. 68, p. 1679-1690, 1987.

SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I.; GOTTSBERGER, G. A polinização de plantas do Cerrado. **Rev. Bras. Biol.**, v. 48, p. 651-663, 1988.

STACY, E. A. et al. Pollen dispersal in low-density populations of three neotropical tree species. **American Naturalist**, v. 148, p. 275-298, 1996.

TELLES, M. P. C. et al. Genetic diversity and population structure of *Eugenia dysenterica* DC. ("cagaiteira" – Myrtaceae) in Central Brazil: spatial analysis and implications for conservation and management. **Conservation Genetics**, v. 4, p. 685-695, 2003.

TELLES, M. P. C. et al. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Anona crassiflora* Mart. – Annonaceae) no estado de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 123-129, 2003.

TRAME, A.-M.; CODDINGTON, A. J.; PAIGE, K. N. Field and genetic studies testing optimal outcrossing in *Agave schottii*, a long-lived clonal plant. **Oecologia**, v. 104, p. 93-100, 1995.

WARD, M. et al. To self, or not to self...A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. **Heredity**, v. 95, p. 246-254, 2005.

WASER, N. M.; PRICE, M. V. **Optimal and actual outcrossing in plants, and the nature of plant-pollinator interaction**. New York, USA: 1983.

WASER, N. M.; PRICE, M. V. Optimal outcrossing in *Ipomopsis aggregata*: seed set and offspring fitness. **Evolution**, v. 43, p. 1097-1109, 1989.

WASER, N. M.; PRICE, M. V. Outcrossing distance effects in *delphinium nelsonii*: pollen loads, pollen tubes, and seed set. **Ecology**, v. 72, p. 171-179, 1991.

WASER, N. M.; WILLIAMS, C. F. Inbreeding and outbreeding. In: (Ed.). **Evolutionary ecology: Concepts and case studies**. New York: Oxford University Press, 2001. p.84-96.

ZIMMERMAN, M.; PYKE, G. H. Reproduction in *Polemonium*: assessing the factors limiting seed set. . **The American Naturalist**, v. 131, p. 723-738, 1988.

ZUCCHI, M. I. et al. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 449-457, 2003.