

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal

ARTHUR DOMINGOS DE MELO

**AS FLORES MORFOLOGICAMENTE COMPLEXAS DE ASCLEPIADOIDEAE
(APOCYNACEAE) E SUA INTERAÇÃO COM DIFERENTES POLINIZADORES**

RECIFE - PE

2015

ARTHUR DOMINGOS DE MELO

**AS FLORES MORFOLOGICAMENTE COMPLEXAS DE ASCLEPIADOIDEAE
(APOCYNACEAE) E SUA INTERAÇÃO COM DIFERENTES POLINIZADORES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Prof^a Dra. Isabel Cristina Machado – UFPE

Co-orientadora: Prof^a Dra. Tarcila de Lima Nadia – UFPE

RECIFE - PE

2015

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Melo, Arthur Domingos de

As flores morfológicamente complexas de Asclepiadoideae (Apocynaceae) e sua interação com diferentes polinizadores. / Recife: O Autor, 2017.

102 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Isabel Cristina Machado

Coorientadora: Tarcila de Lima Nadia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Vegetal, Recife, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Apocynaceae 2. Polinização por insetos 3. Morfologia I. Machado, Isabel Cristina (orient.) II. Nadia, Tarcila de Lima (coorient.) III. Título

583.93

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 601

ARTHUR DOMINGOS DE MELO

**AS FLORES FUNCIONALMENTE COMPLEXAS DE ASCLEPIADOIDEAE
(APOCYNACEAE) E SUA INTERAÇÃO COM DIFERENTES POLINIZADORES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em 26/02/2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Isabel Cristina Machado (Orientadora) – Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Inara Roberta Leal - Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Alícia Noemí Sérsic - Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Argentina

RECIFE - PE

2015



(Prof. Dr. J. H. Svart, 2005)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jurandir Domingos e Maria do Carmo Soares, pelo constante apoio, preocupação e carinho. Sem eles, certamente eu não teria chegado até aqui. É muito bom saber que se tem com quem contar em casa. Estendo, aqui, meu agradecimento a todos de minha família que torceram por mim.

A Antônio Félix, pela companhia e incentivo nesta etapa. Vivemos juntos as mesmas aflições desde a inscrição no processo seletivo até o momento da defesa. Compartilhar tardes de experimentos e madrugadas de escrita fez desta experiência muito mais feliz.

Aos meus amigos, sobretudo à Luiz Mauro e Josias Valentin, pelo incentivo constante e momentos de diversão que me reanimavam para o trabalho.

À Isabel Machado, minha querida orientadora, por ser paciente com meu jeito volúvel e por incentivar minha criatividade. Me considero muito privilegiado por ter uma orientadora tão diva e que demonstra uma preocupação sincera e zelosa com os seus alunos.

À Tarcila Nadia, agradeço pela orientação, confiança e disponibilidade de tantas vezes ter me acompanhado nas coletas. Agradeço especialmente por fazer de cada ida a campo uma grande aprendizagem, compartilhando tão generosamente todo seu conhecimento.

Ao casal Andrea Cocucci e Alícia Sérsic por terem me recebido no Laboratório de Biologia Evolutiva e Floral com tanto carinho, me permitindo vivenciar uma experiência de grande aprendizagem, em especial a Andrea Cocucci pelas horas gastas em produtivas discussões em seu gabinete. Estendo aqui meus agradecimentos aos demais integrantes do laboratório com quem tive o prazer de conviver. Todos foram muitos gentis e disponíveis, fico feliz em dizer que aprendi muito com cada um.

À Ana Pía Wiemer, por ter me mostrado todo seu encanto pelas Asclepiadoideae e compartilhado de seu conhecimento, sobretudo nos trabalhos de anatomia vegetal. Agradeço ainda pela generosa recepção em sua casa e por ser uma companhia tão agradável durante o período em que estive na cidade de Córdoba.

Às técnicas do Laboratório de Anatomia Vegetal, Adriana Perez e Alejandra Trenchi, por terem me acompanhado e auxiliado na realização dos protocolos de anatomia vegetal. Sua disponibilidade e dedicação foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos meus companheiros de pós-graduação e de laboratório pelo ambiente saudável de convivência que me permitiu aproveitar ao máximo minha experiência do mestrado e pela amizade fora da universidade.

Aos organizadores e meus colegas dos Cursos de Campo da Caatinga (ECCA) e da Amazônia (EFA), pela rica experiência que me permitiram participar. Certamente a formação proveniente delas foi um dos pontos fortes desta etapa de minha formação.

Por fim, agradecemos à todos os programas e instituições que tornaram este trabalho possível: à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível) pela bolsa de mestrado concedida; ao projeto PELD (Programa de Pesquisa Ecológica de Longa Duração) Catimbau Pelas instalações e parte do financiamento de campo; à FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo auxílio de mobilidade discente concedida; ao Laboratorio de Ecologia Evolutiva y Biología Floral, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), CONICET–Universidad Nacional de Córdoba por ter me recebido para o desenvolvimento de parte deste trabalho; ao LAMARX (Laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por Rayos da Universidade Nacional de Córdoba) pelas imagens em Lext; ao Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Nacional de Córdoba pelo desenvolvimento das técnicas histológicas; e ao LAVEG (Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco) pelas fotos de microscopia óptica.

RESUMO

As flores de Asclepiadoideae são as mais complexas das Eudicotiledôneas. Todavia muitos de seus sistemas de polinização despertam dúvidas sobre sua natureza generalista ou especialista. Aqui, utilizamos três espécies simpátricas de Caatinga para entender melhor esta questão. Primeiramente tomamos *Marsdenia megalantha* cuja as flores possuem uma aparente especialização para polinização noturna e a corona está associada a anteras em saia e nectários secundários (estruturas incomuns na subfamília). Descobrimos que a corona é principal determinante da interação com polinizadores dada sua morfoanatomia e funcionamento. Reforçamos nossas inferências a partir do comportamento dos visitantes florais. Não encontramos polinizadores efetivos, mas registramos uma pequena quantidade de flores com depósito de polínias e frutos formados em uma proporção semelhante. Apesar disso, a espécie é auto incompatível e depende de polinizadores para reproduzir. As demais espécies são do gênero *Ditassa*. Suas flores são inconspícuas e aparentemente generalistas. Apesar de bastante parecidas e de compartilharem seus grupos de polinizadores, *D. capillaris* é polinizada principalmente por vespas e mariposas enquanto *D. rothundifolia* atrai principalmente pequenas moscas. Buscamos esclarecer que atributos explicariam tais níveis de especialização em flores tão semelhantes. Em uma abordagem pioneira, mostramos como a micromorfometria das flores (sobretudo as estruturas associadas ao néctar e atributos da superfície da pétala) pode fornecer esta explicação. Além disso, ambas espécies de *Ditassa* são polinizadas por formigas, um sistema raro nas Angiospermas, mas com alguns registros em Asclepiadoideae. Verificamos que os atributos das flores de *Ditassa* se assemelham aos de outras flores detentoras deste sistema (incluindo a autocompatibilidade e resistência à secreção da glândula metapleurale das formigas). Como sua morfologia é comum a toda subtribo onde o gênero é incluso, acreditamos que este sistema seja mais comum do que é atualmente conhecido. No que diz respeito às formigas, descobrimos que seus grupos funcionais podem auxiliar na previsão de sua atuação e efetividade como polinizadoras, mas a contribuição pode não ser tão distinta. Assim, concluímos que a corona pode ser a principal determinante da especialização funcional, a micromorfometria pode ser um fator para pequenos níveis de especialização fenotípica e que formigas são uma alternativa para polinização em casos de generalização ecológica no grupo.

Palavras chave: Especialização. Generalização. *Marsdenia megalantha*. *Ditassa*. Morfologia Floral. Micromorfologia. Polinização por Formigas

ABSTRACT

Asclepiadoideae flowers are the most complex of the eudicots. However many of their pollination systems arouse doubts about its general or specialist nature. Here, we used three Caatinga sympatric species to better understand this issue. First, taked *Marsdenia megalantha* whose flowers have an apparent specialization for night pollination and its corona is associated with anthers in skirt and secondary nectaries (unusual structures in the subfamily). We found that corona is the main determinant of interaction with pollinators what's related with its morphoanatomy and operation. We reinforced our inferences from the floral visitors behavior. Unfortunately, we have not found effective pollinators, but recorded a small amount of flowers with pollinia deposit and fruits formed in a similar proportion. Nevertheless, the species is self incompatible and the reproduction dependende of pollinators. The other species are the *Ditassa* genre. The flowers are inconspicuous and apparently generalists. Although very similar and share their groups of pollinators, *D. capillaris* is mainly pollinated by wasps and moths while *D. rothundifolia* mainly attracts little flies. We seek to clarify which attributes explain such specialization levels in so similar flowers. In a pioneering approach, we show how the micromorphometrics flowers (especially the structures associated with the nectar and attributes of the petal surface) can provide that explanation. In addition, both *Ditassa* species are pollinated by ants, a rare system in Angiosperms, but there is some records in Asclepiadoideae. We verified that the attributes of *Ditassa* flowers resemble to those of other flowers which have this system (including the self-compatibility and resistance to secretion of the metapleural ants glands). As its morphology is common to all subtribe where the gender is included, we believe that this system is more frequent than is currently known. With regard to the ants, we found that their functional groups can help in prediction its performance and effectiveness as pollinators, but the contribution may not be so distinct. Thus, we conclude that the corona may be the main determinant of the functional specialization, micromorphometrics might be a factor for small levels of phenotypic specialization and that ants are an alternative for pollination in case of ecological generalization group.

Keywords: Specialization. Generalization. *Marsdenia megalantha*; *Ditassa*; Corone. Floral Morphology. Micromorphology. Ant Pollination

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1 ASCLEPIADOIDEAE (APOCYNACEAE): COMPLEXIDADE MORFOLÓGICA IMPLICA EM ESPECIALIZAÇÃO?	12
2.2 DETERMINAÇÃO DE COMPLEXIDADE FLORAL	12
2.3 FORMAS DE SER GENERALISTA OU ESPECIALISTA	13
2.4 MORFOLOGIA E MECANISMO DE POLINIZAÇÃO EM ASCLEPIADOIDEAE (APOCYNACEAE)	14
2.5 MARSDENIEAE, UMA TRIBO BASAL COM DIVERSAS PECULIARIDADES	16
2.6 METASTELMATINAE UMA SUBTRIBO DERIVADA COM FLORES APARENTEMENTE GENERALISTAS	17
3 MANUSCRITO A SER ENVIADO AO PERIÓDICO AMERICAN JOURNAL OF BOTANY - Dressed for the night: anther skirt drives specialized noctuid pollination of Marsdenia megalantha (Asclepiadoideae-Apocynaceae)¹	18
4 MANUSCRITO A SER ENVIADO AO PERIÓDICO PLOS ONE - Chegando mais perto... a micromorfometria gera níveis de especialização fenotípica nas flores aparentemente generalistas de Ditassa (Asclepiadoideae, Apocynaceae)	39
5 MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO ANIMAL BEHAVIOR - Polinização por formigas em Asclepiadoideae (Apocynaceae): aptidão das flores ao sistema e influência das histórias naturais destes polinizadores	67
6 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXO A. NORMAS DE SUBMISSÃO PARA O AMERICAN JOURNAL OF BOTANY	100
ANEXO B. NORMAS DE SUBMISSÃO PARA A PLOS ONE	101
ANEXO C. NORMAS DE SUBMISSÃO PARA O PERIÓDICO ANIMAL BEHAVIOUR	102

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho busca entender como as flores morfológicamente complexas de Asclepiadoideae interagem com diferentes polinizadores. Sua afamada complexidade estrutural gera fortes expectativas sobre especializações em seus sistemas de polinização. Todavia, parece que esta condição não é tão clara nesta subfamília. Aqui estudamos três espécies de dois gêneros: *Marsdenia megalantha*, *Ditassa capillaris* e *D. rothundifolia*. Nelas, abordamos níveis de generalização *versus* especialização em aspectos ecológicos, fenotípicos e funcionais (ver mapa conceitual nas próximas páginas). A primeira espécie possui uma série de peculiaridades frente ao restante da família e aparenta forte especialização. As outras duas, apesar de muito semelhantes e aparentemente generalistas, distinguem em seus principais polinizadores. Além disso, ambas são polinizadas por formigas, permitindo pela primeira vez elucidar, para esta subfamília, aspectos deste raro sistema de polinização.

Antes de iniciar nossa abordagem, utilizamos uma breve fundamentação teórica afim de fornecer informações para o melhor entendimento deste trabalho. Inicialmente debatemos alguns conceitos básicos importantes para a compreensão dos manuscritos. São eles a determinação de complexidade floral e as diferentes formas de generalização ou especialização. Em seguida descrevemos de forma precisa a morfologia e o mecanismo de polinização das flores de Asclepiadoideae. Por fim, localizamos as espécies estudadas dentro da subfamília e fornecemos algumas informações genéricas sobre os sistemas de polinização nas tribos e subtribos onde estão inseridas.

No primeiro capítulo, abordamos aspectos fenotípicos e funcionais do sistema de polinização. Fizemos isso a partir de testes e descrição do papel da singular corona de *Marsdenia megalantha*. Neste trabalho, realizamos ensaios de coração de estruturas secretoras e de néctar, descrevemos a anatomia da flor e o comportamento dos visitantes. Juntas, estas informações nos permitiram entender o mecanismo de polinização da espécie e esclarecer algumas dúvidas frente a presença de estruturas exclusivas da tribo Marsdenieae tais como nectários secundários e anteras em saia. Também testamos sistema reprodutivo e efetividade de polinização e frutificação da espécie.

Em seguida, no segundo capítulo, partimos de uma especialização ecológica gerada por diferentes frequências e efetividades de polinizadores compartilhados por duas espécies de *Ditassa*. Esta informação provém de dados de observação de visitantes florais e testes referentes as suas efetividades e frequências. Tais testes mostraram que pequenas moscas

garantem a polinização de *D. rothundifolia*, enquanto vespas e mariposas a de *D. capillaris*. Assim, utilizamos a micromorfometria para verificar a existência de algum nível de especialização fenotípica imperceptível a olhos humanos, mas capaz de atuar sobre a atração e interação dos visitantes gerando níveis de especialização ecológica. Nossos principais focos neste trabalho foram sobre a apresentação de recurso, superfície das pétalas e estruturas ligadas ao mecanismo de polinização.

Por fim, no terceiro capítulo, ainda utilizando as espécies de *Ditassa*, analisamos pela primeira vez a polinização por formigas em Asclepiadoideae. Apesar de existirem outros registros na subfamília, estes são pouco precisos, anedóticos e não trazem detalhes da interação. Essa situação impede a compreensão dos fatores fenotípicos que a possibilitam. Sobretudo, porque a polinização por formigas é muito rara entre as angiospermas e demanda uma série de requisitos para que possa ocorrer. Nesse aspecto, destaca-se a resistência do pólen à secreção antibiótica da glândula metapleural das formigas, nunca antes testada entre as Asclepiadoideae. Também nos atemos ao fato das formigas que promovem a polinização se tratarem de espécies com histórias naturais altamente distintas. Assim, de forma inédita, aproveitamos a ocasião para comparar seus comportamentos na atuação e efetividade como polinizado

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ASCLEPIADOIDEAE (APOCYNACEAE): COMPLEXIDADE MORFOLÓGICA IMPLICA EM ESPECIALIZAÇÃO?

Uma das informações mais recorrentes em toda a literatura utilizada na elaboração desta dissertação é em relação a complexidade das flores de Asclepiadoideae. Embora com distintos objetivos, perguntas e abordagens, todos os autores ressaltam de alguma forma essa questão. De fato, é difícil não considerá-la quando se tratam das flores mais morfológicamente especializadas e estruturalmente complexas dentre as Eudicotiledôneas (ENDRESS & BRUYNS 2000; ENDRESS *et al.*, 1996). Em um nível maior, considerando todas as Angiospermas, esta subfamília é equiparável à Orchidaceae, a maior de todas as famílias botânicas e com flores altamente singulares (DRESSLER, 1993; MONDRAGÓN-PALOMINO, 2008). Apesar disso, uma grande questão é levantada quando se abordam as Asclepiadoideae: Até onde a especialização morfológica reflete-se em um sistema de polinização especializado?

Alguns autores têm tentado responder essa pergunta, sendo possível destacar os trabalhos de (OLLERTON *et al.*, 2007; OLLERTON & LIEDE, 1997; WOLFF *et al.*, 2008). Segundo eles, parece que os sistemas de polinização desta família não se encaixam de forma clara na dicotomia “generalista x especialista”. Tal situação abre um amplo espaço para o estudo e debate sobre o que de fato é generalização, utilizando a família como modelo. Mas para entender adequadamente essa relação entre a complexidade floral e sistemas de polinização especializados é importante compreender bem o que cada um destes conceitos aborda.

2.2 DETERMINAÇÃO DE COMPLEXIDADE FLORAL

A noção de complexidade floral, leva em conta um arranjo floral particular que afasta-se de um padrão mais simples que é caracterizado por simetria actinomorfa, verticilos separados e com muitas peças livres. No caminho oposto, em favor da complexidade, encontramos, alterações da simetria, conações, adnações, alterações de funcionalidade nos verticilos ou modificações ou surgimento de estruturas peculiares

em alguma parte da flor. Alguns exemplos são cálices com cálcares, pétalas-estandarte, anteras vibráteis, estigmas em carretel, entre outros. Todos estes atributos são amplamente explorados por botânicos ou naturalistas treinados em morfologia comparativa como é o caso de (ENDRESS *et al.*, 1996; FAEGRI & PIJL, 1979; FRAME, 2003; PROCTOR *et al.*, 1996; VOGEL, 2006). Existe uma forte inclinação em associar complexidade floral à especialização, seja ela no aspecto evolutivo (tornar-se mais derivado a partir de um ancestral) ou no sistema de polinização (caso onde há especificidade de polinizadores). Apesar de existirem plantas cuja os ancestrais possuíam flores mais arrojadas morfologicamente, caso de plantas anemófilas, onde especializar-se não implica em tornar-se mais complexo (BLASER, 1941; RUDALL *et al.*, 2005). No caso das Asclepiadoideae, seus ancestrais dentro de Apocynaceae possuíam uma morfologia mais simples, de modo que a evolução do grupo esteve associada a um aumento de complexidade (ENDRESS & BRUYNS, 2000).

2.3 FORMAS DE SER GENERALISTA OU ESPECIALISTA

No que diz respeito ao sistema de polinização, a questão da generalização ou especialização pode assumir diferentes perspectivas. Em uma abordagem mais tradicional, é um consenso que flores generalistas são pequenas, claras, com simetria radial e recompensa exposta. Esse aspecto é conhecido como generalização fenotípica e diz respeito principalmente a capacidade de atração e acesso ao recurso e mecanismo de polinização por vários visitantes (OLLERTON *et al.*, 2007). Uma outra abordagem, discutida por (ARMBRUSTER *et al.*, 2000) é considerar a funcionalidade da flor. Neste sentido tratamos de especialização funcional, quando o seu mecanismo de polinização só puder ser acessado por um determinado grupo funcional de polinizadores que estejam inclusos em um determinado táxon, ou possuam afinidades morfológicas. Por fim, uma terceira abordagem, inspirada sobretudo em métricas de ecologia de comunidades é considerar o número real de espécies polinizadoras que a planta tem (ARMBRUSTER *et al.*, 1998; FENSTER & RODRÍGUEZ, 2007).

Nestes aspectos é complicado definir como se dá a generalização e especialização em Asclepiadoideae, uma vez que estes três conceitos nem sempre se sobrepõem. Em Asclepiadoideae são incomuns registros como os de Orchidaceae onde há diversos casos de interação um pra um, a exemplo das emblemáticas interações entre

Xanthopan praedicta e a flor de *Angraecum sesquipedale* (ARDITTI *et al.*, 2012) e *Campsoscolia ciliata* e as flores de *Ophrys (ciliata) speculum* (AMES & AMES, 1937). Nesta subfamília mesmo as flores mais fenotipicamente especializadas, que são as do gênero *Ceropegia* com atributos de sapromiiofilia, podem ser polinizadas por qualquer mosca de um determinado tamanho (OLLERTON *et al.*, 2009). Essa condição indica um elevado grau de especialização funcional, mas uma forte generalização ecológica. Por outro lado, o oposto também ocorre, havendo espécies cuja o fenótipo é capaz de atrair diversos tipos de visitantes florais, mas há uma forte restrição em quais deles realiza polinização (LIEDE & WHITEHEAD, 1991).

2.4 MORFOLOGIA E MECANISMO DE POLINIZAÇÃO EM ASCLEPIADOIDEAE (APOCYNACEAE)

A principal distinção das Asclepiadoideae é o fato delas possuírem três estruturas exclusivas em suas flores: corona, ginostégio e polinário. A corona é um verticilo vegetativo adicional. Ela pode ter uma ampla diversidade de formas (FISHBEIN, 2001; LIEDE & KUNZE, 1993). e desempenha um importante papel no direcionamento do comportamento do polinizador (KUNZE, 1997; OLLERTON & LIEDE, 2003; VIEIRA *et al.*, 2012; WIEMER *et al.*, 2011; WOLFF *et al.*, 2008). O ginostégio é um órgão interno formado por uma complexa sinorganização entre os verticilos reprodutivos. Sinorgnaização é definida como a ligação estrutural íntima de dois ou vários elementos estruturais vizinhos para formar um sistema ou aparelho funcional (ENDRESS, 1990). Neste caso, e Asclepiadoideae, o androceu está unido com o gineceu, esta união se dá na parte superior das anteras com a porção inferior da cabeça do estigma. Desta união formam-se cinco fendas, cada uma, delimitada pelas bordas de anteras adjacentes, no interior há uma câmara formada pelo tecido dos filetes. Há um epitélio glandular nestas cavidades chamadas de câmaras estigmáticas, esse epitélio exerce papéis fundamentais na reprodução, que são: a produção do recurso floral para os polinizadores (néctar) e de meio adequado para o crescimento de tubos polínicos. Os meios são: o néctar (KEVAN *et al.*, 1989), e a mucilagem (VIEIRA & SHEPHERD, 1999). Acima de cada uma das fendas há um polinário. Este por sua vez, é formado por três estruturas: um par de polínias, um par de caudículos e um corpúsculo. As polínias são provenientes das anteras diferentes que estão uma ao lado da outra.

Estas polínias estão ligadas ao corpúsculo pelos caudículos. Tanto, corpúsculos, quanto caudículos são secreções enrijecidas provenientes da cabeça do estigma. O corpúsculo possui uma fenda que o permite prender-se como um grampo aos polinizadores (VERHOEVEN & VENTER, 2001).

A forma como ocorre mecanismo de polinização se dá em duas etapas. A remoção das polínias e a inserção das mesmas. Segue uma descrição baseada nos relatos de (BOOKMAN, 1981; ENDRESS, 1996; GALIL & ZERONI, 1965; KUNZE, 1997; VIEIRA *et al.*, 2012; WIEMER *et al.*, 2011). Na primeira etapa o inseto introduz uma determinada parte do corpo (mais comumente parte do aparelho bucal ou extremidades das pernas) na parte inferior de uma das fendas. Ele faz isso na intenção de retirar o néctar acumulado abaixo da fenda, ou segurar-se usando o ginostégio como apoio. Ao tentar remover essa parte do corpo, o inseto acidentalmente o encaixa na região basilar da fenda. Uma vez “capturado” pela fenda, ela funciona como um trilho, que deve ser percorrido em toda a sua extensão, de baixo para cima. Como o corpúsculo do polinário posiciona-se logo acima da fenda, em linha reta, o aparelho bucal encaixa-se em seu sulco, resultando na remoção do polinário. Por ser composta de esclerênquima e eventualmente possuir tricomas, as bordas das anteras que formam a fenda impedem que a parte do corpo do inseto seja removida antes de terminar o percurso. Algumas vezes existe uma pequena câmara entre a câmara estigmática e a parte exterior dos trilhos. Nesta câmara, dita corpuscular a parte do corpo do polinizador é direcionada de forma precisa à fenda do corpúsculo. Na segunda etapa, a inserção da polínia ocorre de modo semelhante à remoção do polinário, mas desta vez o a parte do corpo do polinizador tem um polinário aderido. No momento da remoção, uma polínia está inserida na câmara estigmática e um caudículo se rompe liberando-a do corpúsculo que permanece aderido ao corpo do polizador.

Frente este a este mecanismo de polinização fica fácil entender porque as espécies de Asclepiadoideae são um sistema modelo ideal para estudar questões de generalização e especialização. Os polinários continuam anexados aos visitantes florais, mesmo quando polínias são depositados em uma flor. Assim, os polinizadores são facilmente identificados e verificadas suas taxas de sucesso (OLLERTON & LIEDE, 1997; 2003; WIEMER *et al.*, 2011; WOLFF *et al.*, 2008; WYATT *et al.*, 2000). Além da possibilidade de interação com estes vários polinizadores, as peculiaridades em seu mecanismo de polinização, permitiram às Asclepiadoideae registros notáveis, como por

exemplo: o primeiro caso de transporte de pólen em línguas de pássaros, tal fato se dá com corpúsculos prendendo-se às papilas destes órgãos (PAUW, 1998); a única forma de confronto masculino “corpo a corpo” em vegetais, onde a presença de espinhos em caudículos evita a concatenação de polinários (COCUCCI *et al.*, 2014); um mecanismo exclusivo de autopolinização chamado de germinação de pólen *in situ*, onde o néctar acumula-se e alcança as polínias fazendo-as germinar (YAMASHIRO & MAKI, 2005); e o primeiro caso de polinização associada a mutilação do polinizador, onde o para que ocorra a polinização as vespas polinizadoras perdem seus palpos (SHUTTLEWORTH & JOHNSON, 2009). Estas situações mostram o quanto o estudo destas flores pode propiciar descobertas científicas relevantes.

2.5 MARSDENIEAE, UMA TRIBO BASAL COM DIVERSAS PECULIARIDADES

Uma das espécies objeto de estudo de nosso trabalho é *Marsdenia megalantha*. Esta espécie pertence a uma tribo com uma série de peculiaridades e nos chamaram atenção afim de testar nossas hipóteses. Algumas das principais características da tribo são polínias eretas de formato arredondado ou achatada e sua corona de formato peculiar. Sua corona tem lobos livres e é de aspecto carnosa, e mantem-se, parcialmente ou totalmente ligado à base do ginostegio e/ou a parte de trás das anteras (FISHBEIN, 2001; MORILLO, 1978). Em alguns gêneros a borda das coronas ou mesmo anteras formam uma aba com a parte mais externa levemente revirada (WANNTORP *et al.*, 2006), algumas vezes contendo nectários secundários (OMLOR, 1998), sendo o único grupo da subfamília que possui tal estrutura. Algumas das peculiaridades mais esdrúxulas em coronas e ginostégios estão em Marsdenieae como é o caso de *Hoya spartoides* (KUNZE & WANNTORP, 2008).

Marsdenieae é um grupo basal dentro da subfamília e que também está presente no Velho Mundo, apesar disso, os representantes do gênero *Marsdenia* no Novo Mundo parecem ter um ancestral comum (RAPINI *et al.*, 2007). Talvez por isso, seja um dos mais bem definidos dentro das Asclepiadoideae da América (MORILLO, 1978). É bem suportado que Marsdenieae é um clado irmão de Ceropegeae (MEVE & LIEDE, 2007) tribo que contém os emblemáticos gêneros *Ceropegia* e *Stapelia*.

Apesar dos sistemas mais fenotipicamente especializados de Asclepiadoideae ocorrerem em seus grupos irmãos, parece que em Marsdenieae, essa situação é menos frequente. (OLLERTON & LIEDE, 1997) sugerem que o acesso aberto e a polinização por moscas predominam na tribo, com uma contribuição menor de Hymenoptera, Lepidoptera e Coleoptera. Por outro lado, a polinização por mariposas é muito comum na tribo, com uma série de exemplos em *Hoya*, e casos de espécies com atributos para a falenofilia (síndrome de polinização por mariposas), tais como, emissão noturna de odor e néctar (ALTENBURGER; & MATILE, 1988), juntamente com a existência de flores brancas tubulares (POTT *et al.*, 2002).

2.6 METASTELMATINAE UMA SUBTRIBO DERIVADA COM FLORES APARENTEMENTE GENERALISTAS

As outras duas espécies abordadas neste estudo são pertencentes ao gênero *Ditassa* que está incluso na Subtribo Metastelmatinae: *D. capillaris* e *D. rothundifolia*. Metastelmatinae, juntamente com Oxypetalinae e Gonolobinae, compõe um clado conhecido como MOG. Esse clado é exclusivo do Novo Mundo e apresenta uma ampla diversidade floral que vai desde flores grandes e vistosas até flores pequenas e incospícuas (RAPINI, 2002;2012; RAPINI *et al.*, 2007). Ao que parece, Metastelmatinae é de diversificação bastante recente e tem flores que sugerem uma forte generalização. Segundo os mesmos autores, a corona das espécies deste grupo é bastante plástica, mesmo em nível populacional e a morfologia floral pode causar uma série de inconsistências a exemplo do que ocorre com espécies do gênero *Metastelma*.

No que diz respeito aos seus sistemas de polinização, apesar do mecanismo complexo das Asclepiadoideae, elas parecem ser visitadas por um grande número de animais. As espécies de *Ditassa* que geralmente são brancas, pequenas e de acesso aberto encaixam-se no padrão de generalização fenotípica (OLLERTON *et al.*, 2007). Apesar disso, (WOLFF *et al.*, 2008) conseguiu identificar alguns casos onde existe a presença de polinização preferencial por moscas e pequenas abelhas.

3 MANUSCRITO A SER ENVIADO AO PERIÓDICO AMERICAN JOURNAL OF BOTANY - Dressed for the night: anther skirt drives specialized noctuid pollination of *Marsdenia megalantha* (Asclepiadoideae-Apocynaceae)¹

Arthur Domingos-Melo^{2, 3}, Tarcila L. Nadia⁴, Ana P. Wiemer⁵, Andrea A. Cocucci⁵, Isabel C. Machado²

¹Manuscrito original

²Departamento de Botânica, Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva Polinizar – Centro de Biociências -Universidade Federal de Pernambuco Recife Brasil

⁴Núcleo de Biologia - Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco Vitória de Santo Antão Brasil

⁵Instituto Multidisciplinar de Biología Vegetal - Universidad Nacional de Córdoba, CONICET, FCEfyN, Cordoba, Argentina

³Autor para correspondência- e-mail: arthurdom.melo@gmail.com

ABSTRACT

PREMISE OF THE STUDY : In a number of species in the milkweed tribe *Marsdenieae*, the already complex basic *asclepiad* flower structure is further elaborated by the evolution of one morphological novelty, *i.e.* anther skirt. Since the functional significance of this trait is poorly understood we investigate its role in the pollination mechanism.

METHODS: We carried out studies at *M. megalantha* in the Caatinga (Brazil). We have tested the phenotypic integration of anther skirt; we describe its functional anatomy; identify and record the operation of its nectaries; we recorded and tested in laboratory its contribution to the pollination mechanism; and we indicate the effectiveness of this system.

KEY RESULTS: The anther skirt and its nectariferous glands drive functional specialization to *Noctuidae* pollination. This is due to its particular morpho-anatomy related to its ability both to secrete and contain nectar independently from the stigmatic chamber. In addition, the anther skirt functions as a funnel and can be understood in the light of the pollination mechanism as coordinated with the corona and gynostegium. The interaction of this structure with the *Noctuid* moths, confirmed both by field observations and manipulative experiments, is effective in producing pollination.

CONCLUSIONS: The characteristics of anther are essential in the specialized *noctuid* pollination of *Marsdenia megalantha*. We suggest that features associated to *noctuid* pollination in this species may be applicable to other species of the tribe. This shows that floral structures that are taxonomic features can be highly informative about details of the floral mechanism and provide baselines for the pollination system in the group in which they occur.

KEY WORDS: Floral biomechanical; Caatinga; diagnostic features taxonomic; complex flowers; functional floral anatomy; Lepidoptera pollination ; Marsdenieae tribe; moth pollination; pollination mechanism; substitutive nectaries

INTRODUCTION

Flowers are the most informative organs of angiosperm diversity, since they are instrumental assess taxonomic identity, due to their high variability, and evolutionary relatedness, due to their associated phylogenetic signal (Prenner et al 2010; Kohn 1996; Singh and Subramaniam 2008). At various taxonomic levels singular features are often diagnostic of certain groups. These include many examples such as the elaiophores on the sepals of most neotropical Malpighiaceae (Vogel 1990); the labellum of Orchidaceae and other lilioid monocots (Rudall 2002); the trichome covered staminode in the subtribe Jacarandinae (de Vattimo, 1984) or the syncarpous ovary of *Allamanda* within the otherwise apocarpous Apocynaceae (Fallen 1985). Considering that evolution of flowers occurs in an integrated way, it is important to empirically recognize an adaptive value to explain the maintenance of this structures in such lineages (Gould and Lewontin 1979). Therefore, some studies go beyond the simple characterization of morphological features and seek to understand their functions (see respectively, Possobom et al (2015), Teixeira et al (2004), Guimarães et al (2008) and Araújo et al (2014)). In this context we highlight the anther skirt, an exclusive structure of the Marsdenieae tribe that adds complexity to the already elaborate flowers of Asclepiadoideae. We present in this work the functional role of this structure that drives of the pollination by noctuids with unusual transfer of pollinarium in its legs.

Asclepiadoideae (Apocynaceae) stand out for having singular structures already well-enlightened about their functionalities. This group has the most complex flowers of the Eudicots, with three exclusive structures: corona, gynostegium and the pollinarium, which collectively represent a strong taxonomic specificity and have key biomechanical roles in the pollination. In relation to the corona and the gynostegium, studies have already established associations between morphology and either attraction of visitors, pollination efficiency and differential pollinarium attachment sites on the pollinator body (Ollerton and Liede, 2003; Wiemer et al. 2012, Wolff 2009, Meve and Liede, 2008; La Rosa and Conner 2017). The guide rails and pollinarium system are considered part of a complex mechanical contrivance (Wiemer 2012; Vieira 2006) capable of explaining notable behaviors such as ant-pollination (Domingos-Melo et al, 2017), male-to-male confrontation through pollinator concatenation (Cocucci et al., 2014), pollen transport on the tongues of birds (Pauw 1998) and pollination by

mutilation of pollinator appendages (Shuttleworth and Johnson, 2009). In addition to these peculiarities, Marsdenieae, a subfamily of Asclepiadoideae, has the anther-skirt, a unique structure whose function remains unknown.

The anther skirt in Marsdenieae develops out at the sides from each free lobe of the fleshy staminal corona. The skirt merges with the anther and, in some species, anthers have revolute margins below. These margins stand out from the filament and surround the gynostegium, and this configuration is associated with the shape of a skirt (Fishbein, 2001; Morillo, 1978; Wanntorp et al., 2006; Kunze and Wanntorp, 2008). In addition, secondary nectaries are frequently associated to this structure (Omlor, 1998). Although this anther-skirt is a morphologically well-characterized structure and has recognized taxonomic importance in the well-supported Marsdenieae tribe, nothing is known about its function in the pollination mechanism (Wanntorp et al., 2006; Kunze and Wanntorp, 2008; Rapini et al., 2007; Morillo, 1978). In addition to this knowledge gap, there is a strong lack of information about pollination biology in the whole tribe. Since nectar is not concealed Ollerton and Liede (1997) have suggested that fly pollination should predominate, with a lower contribution of Hymenoptera, Lepidoptera and Coleoptera.

Our aim is to clarify the role of anther skirt and its secondary nectaries. To this end, we use as model *Marsdenia megalantha*, whose anther skirt is well known (Goyder and Morillo, 1994; Kunze and Wanntorp, 2008), to (1) perform morphometry and point out the relationship between the anther skirt and other floral parts; (2) describe the floral anatomy and locate the different nectaries types; (3) portray how anther skirt and secondary nectar interact with pollinators through field observations and describe the pollinating mechanism; (4) we confirm the functionality of these structures through manipulative experiments; and finally, (5) point out the effectiveness of the system quantifying flowers pollinated, fruit and seed set.

MATERIAL AND METHODS

Model species and populations studied

Marsdenia megalantha Goyder and Morillo occurs in some inselbergs in the Caatinga from Brazilian Northeast. Its ranges from east Ceará to the central Bahia

(speciesLink, 2016). *M. megalantha* presents one of the largest flowers in the genus. These are greenish-brown, bell-shaped, pendulous (Fig. 1A) and exude scent exclusively at night, which smells like and has components of rotten bananas composed mainly of isoamyl acetate (A. Domingos-Melo, UFPE, unpublished data). These traits suggest a phenotypic specialization (Ollerton 2007), although pollinators are still unknown.

We conducted our studies in two populations, one located on a sandstone outcrop (8°30'57"S, 37°13'58"W) in the Parque Nacional (PARNA) do Catimbau (Pernambuco – Brazil), an area of shrubby Caatinga with a semi-arid climate whose average annual temperature and precipitation are respectively 25°C and 1095.9 mm (Andrade *et al.*, 2004). The second population was located on a set of rocky outcrops (7°28'51"S 36°54'40"W) in the Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Fazenda Almas (Paraíba – Brazil), an area of arboreal or shrubby Caatinga, where average annual temperature and precipitation are respectively from 26 to 30 °C and around to 500 to 800 mm (Velloso *et al.* 2002).

Morphometry

We examined under stereomicroscope flowers of *Marsdenia megalantha* collected fresh in the field and fixed in alcohol 70%. We defined 12 external morphometric characters of corolla, corona, anther skirt, gynostegium and pollinarium insertion mechanism. We photographed 60 fresh flowers (one per individual) in the field in RPPN Almas population, using a scale. The photographs consisted of transversal images of the adaxial face of the entire flower and longitudinal images of the flowers sectioned across one of the five planes of actinomorphic symmetry. Through ImagenJ software, we did the measures, and we calculate the correlations among them.

Floral anatomy – Nectar localization

We performed longitudinal and cross histological sections of the collected flowers. For this, we fixed the flowers in FAA (1: 4: 1, Formalin-Ethanol-Acetic Acid) at room temperature for 48 hours. Then we dehydrated the samples in an alcoholic series from 60 to 100% for one hour at each concentration and then overnight in

butanol. Subsequently, we clarified the samples with pure xylol and included in Paraplast. We made serial cuts of 10 and 12 micrometers of thickness in a Minot microtome. The sections were sliced on heating plate at 36°C with water and dewaxed with a decreasing series of ethanol until it reached distilled water. We stained with Astra Blue for 15 min and Basic Fuchsin for 1 min, washing with distilled water for five minutes after each staining. We passed the samples to 50% ethanol, and after drying were placed in xylol and mounted with Artificial Canada Balsam.

To locate flower secretory structures, we used a Neutral Red and tap water solution (1: 10,000) as vital stain (Kearns and Inouye, 1993). To do so, we bagged pre-anthesis flower buds at then collected open flowers at 10pm and submerged them in neutral red solution during four hours. Then we washed the flowers with tap water and dissected them to identify the colored areas.

Pollination mechanism

To record floral visitors of *M. megalantha* we carried out focal observations and active searches in shifts of 4 to 10 hours. For both populations, we accumulated 400 observations hours along two consecutive years (03/2013 to 04/2015). We consider as pollinators animals that removed and deposited pollinia. This is evident by the presence of pollinaria attached to the body of animals that lack one or both pollinia. Pollinators were dry-mounted for identification and deposited in the collection of flowers visitor insects of the Floral Biology Laboratory (UFPE).

We made detailed observations and photographed flowers and pollinators during their visits to describe the pollination mechanism. We took into account how they accessed to floral reards, how they positioned and moved in the flower and payed special attention to the moment they removed or deposited pollinia.

Records and experiments of the mechanical and secretory function of anther skirt

We conducted laboratory simulations tests to confirm how the anther in skirt participates in the pollinating mechanism. We used flowers fixed in FAA 70% because floral structure and stiffness is preserved in good conditions without loss of its mechanical functioning and allowing its manipulation. In addition, the use of fresh

flowers it became impracticable, since a great amount of latex exudated when the anthers skirt were removed. We removed the corolla from the flowers, held them on metal rods and slipped the legs of the pollinators onto the guide rail system with the help of tweezers. In this way, we simulated the pollination mechanism and checked in detail the path of the legs along the guide rail. This assay was performed on intact flowers and other flowers that had their anthers skirt removed with a scalpel.

We performed focal observations recording the moments and the sites of nectar accumulation throughout the anthesis to determine how nectar is presented. We quantified volume and concentration of nectar of the secondary nectaries when amount allowed collection. For this, we bagged pre-anthesis flowers ($n = 18$ flowers / 6 individuals) and removed the nectar with the help of graduated microsyringes three hours after the beginning of the secretory activities and measured the concentration of sugar with a pocket refractometer. We performed nectar-staining experiments to test whether there was communication between different sites of accumulation in the same flower. We conducted this experiment in the field with flowers we cut through the pedicel and immediately inserted into a colloidal array of Agar-Agar and 2% water in acrylic boxes (gerbox). In this way, we avoided any external interference, such as shaking of the branches or contact of visitors, that could spread the dye between the nectar compartments by means other than the nectar flux itself. In the gerbox the nectar secretory activity is maintained, which allows to observe the extravasation of nectar within flowers. We placed Methylene Blue dye on one of the nectar accumulation sites and observed its diffusion. After four hours, we checked if the dye had reach from oone compartment to the other.

System effectiveness

To determine the effectiveness of the system, we recorded i) pollen deposition and removal in the flowers and ii) the fruits and seed set due to open pollination. For this, we collected a random sample of flowers from the PARNA Catimbau population (120 flowers / 30 individuals) during the flowering peak period (April and June 2014) and preserved them in 70% alcohol. In the laboratory, we counted under stereomicroscope the number of removed pollinaria and deposited pollinia. To determine the natural fruit set, we marked flowers that were left exposed to pollinators

(120 flowers / 30 individuals) and monitored the development of the fruits. To ensure that fruit formation was due to the pollinator action alone, we verified whether there was fruit set by spontaneous self-pollination monitoring flowers bagged at pre-anthesis (100 flowers / 30 individuals). We verified if the number of pollinated flowers would explain the number of fruits formed. We also compared the number of ovules per flower in relation to the number of seeds by fruit ($n = 15$ individuals).

RESULTS

Morphometry

Flower are pendulous and bear campanulate corolla concealing the corona and gynostegium at the centre (Figure 1 – A). The corona lobes are robust and rounded, between them the system of rails belonging to gynostegium is evident. Beneath each guide rails there is a stigmatic chambers and above it there is a pollinarium (Figure 1 – B, E). The anther skirt surrounds the base of the gynostegium, it is a continuous structure, extending from the lower part of the guide rails through the rough edges on lower margins of the corona lobes, under which it forms a small evagination (Figure 1 – D, E). Under the anther skirt chambers are located, that are delimited internally by the base of gynostegium and corolla tube, externally by trichomes of the corolla and at the upper part by the corona lobes (Figure 1 – C).

Among the 12 measured characters, those related to anther skirt and corolla presented the highest variation coefficients and there was greater conservatism in the measurements of corona and gynostegium (Table 1). The correlations of the anther skirt measurements are similar to other correlations among floral parts ($t=0.38$; $p=0.35$), which may indicate that the flower is integrated in general. Even so the anther skirt has prominent correlations with some particular traits, especially the corona (Table 1).

Floral anatomy– Nectar localization

The anther skirt and corona lobes are basically constituted by a thick spongy parenchyma which seems to ensures its robust structure. Their surface consists of a

smooth and thick layer of hydrophobic tissue, unlike the petal surface which is thin and rough (Figure 2- A , B). (Figure 2- A, B).

Neutral red test revealed presence of nectar in two flower compartments: inside each of the five separated stigmatic chambers, where coloration was uniform and intense (Figure 2 - C), and on the underside of skirt, with discontinuous spotty and less intense staining (Figure 2 - D). In both regions, a secretory tissue is evident in the histological sections (Figure 2 - E, H). The tissues, although having some similarity between chambers, there are some differences in structure. In the stigmatic chamber the tissue is organized into an evident secretory epithelium with distinct sub-epidermal layers (Figure 2- F, G). Under the anther skirt, nectary is formed by secretory cells not clearly organized in layers (Figure 2-1 I J).

Pollinators and pollination mechanism

Moths of the family Noctuidae (Lepidoptera) (Figure 3– A and B) were the only pollinators recorded in both populations (PARNA Catimbau e RPPN Almas). These insects are able to perform the pollination, *i.e.* they were the only seen removing pollinaria or depositing pollinia. Collected specimens carried pollinaria with and without pollinia. Corpuscula were always attached to the tarsal claws (Figure 3 - C). Occasionally we found legs of these animals trapped in the flowers by the guide rails.

The noctuids land inside the corolla where they hold easily on their rough surface (Figure 3 - D). To access the nectar, they grasp the corona and insert their proboscis into the nectariferous chamber beneath the skirt (Figure 3 - E). In this position, they place their legs between the lobes of the corona and over the anther skirt. Because the surfaces of these structures are slippery, their legs are caused to slide directly into the entrance of the guide rail. After entering into the rail, leg needs to continue sliding along the guide rail to the other end for it to be released. In an attempt to release the leg from the guide rail, the noctuids direct the tarsal claw into the corpuscular chamber which is continuous with the corpuscular groove. Then, the corpusculum clings onto the tarsal claw and finally is let free by pulling out the whole pollinarium. For pollinium deposition, the mechanism works in the same way, but instead of inserting of the leg, one pollinium is inserted in the guide rail and the pollinarium let free once it is cut off from the cuadicle.

Records and experiments of the mechanical and secretory function of anther skirt

When sliding the noctuid legs experimentally over the anthers skirt, we see that their slope between the corolla lobes and their smooth surface let the legs slip easily towards the entrance of the spoke guide. But when we remove the anther skirt with a scalpel is formed an angle of 70° at the base between the crown lobes. From then on, when we make the same movement of sliding the noctuidae's legs, they attach on the vertice between the lobes of the corona before accessing the entrance of the ray guide.

We observed throughout anthesis a small and immeasurable amount of secretion in the inner part of the stigmatic chamber. In the skirt chamber, nectar was present only at night, when the droplets started to form and started to emerge from below the skirt about 07:00 p.m. Total nectar amount accumulated until 10:00 p.m. was $3.4 \pm 1.5 \mu\text{l}$ and concentration $24.1 \pm 3.4\%$, this production is maintained throughout the night. Nectar coloring showed that there is no communication between the anther skirt chambers and stigmatic chambers, since there was no dye diffusion between them (Figure 4 – A, B).

System effectiveness

We found that 29% of the flowers with one to three pollinaria removed and that 5% of the flowers had a pollinium deposited. In total there were 58 pollinaria removed and six pollinia deposited, resulting in a deposition/removal ratio of about 1/10.

Fruit set under natural pollination is 6% of the amount flowers, this equals to that observed for pollen deposition ($\chi^2 = 296$, $gl = 1$, $p = 0.5866$). Although we did not quantify it, we verified in the field that fruits formed by two carpels were atypical. The fruits formed by a single carpel had $XX \pm XX$ seeds, this equals to amount ovules, $XX \pm XX$ by carpel ($t = 2.11$; $gl = 11$; $p = 0.058$). There was no fruit set by spontaneous self-pollination.

DISCUSSION

Present results show the role of the anther skirt in *Marsdeniamegalantha* and its nectaries (nectariferous tissue inside the nectariferous chambers) in relation to functional specialization to Noctuidae pollination. This is due to its particular morpho-anatomy related to its ability both to secrete and contain nectar independently (and secondarily) from the stigmatic chamber, the primary nectar. In addition, the anther skirt can be understood in the light of the pollination mechanism as coordinated with the corona and gynostegium,. The interaction of this structure with the Noctuid moths, confirmed both by field observations and manipulative experiments, is effective in producing pollination.

Funnel mechanical function of anther skirt

The anther skirt of *M. megalantha* is functionally associated with other flower structures in the essential in pollination: the corona and gynostegium. The corona is a whorl derived from the androecium showing extensive variation in configurations across groups of Asclepiadoideae; the gynostegium represents the organ of pollinarium removal and pollinium deposition (Fishbein, 2001; Liede and Kunze, 1993). The conservatism in the structure of these flower parts in *M. megalantha* with respect to other Asclepiadoideae can be explained by their engagement in mechanical aspects of pollination, because they interact equally well with the appendages of insects no matter what kind of insect (Fishbein, 2001; Wanntorp et al 2006; Baranzelli et al. 2014; La Rosa and Conner, 2017). Additionally, the anther skirt determines the positioning of the noctuid in the flower to access the mechanism in corona and gynostegium. This fit between the body of the pollinator and flower is fundamental to the success of a pollination mechanism (Campbell et al, 1996; Nilsson, 1988).

Anther skirt differs in anatomy from the corolla and resembles corona. This may provide clues about its function. While the corolla of *M. megalantha* has a rough surface, which allows pollinators to move around on the flower without slipping (see Whitney 2009), the anther skirt and corona are massive, rounded and smooth due to their spongy parenchyma as well as their smooth and thick epidermis. This feature makes them slippery and funnel insect appendages toward the rail system. Both through field observations and manipulation experiments, we recorded that the anther skirt deflects the legs of Noctuids towards the gynostegium. We hold the view that one important

effect of the anther skirt in *M. megalantha* is to mechanically guide the pollinator. We believe that the same is possible in the other species of the tribe that share this structure with *M. megalantha* (Wanntorp and Kunze 2009).

Substitutive nectaries in anther skirt

A disk nectary surrounding the ovary is the basal condition of the Apocynaceae (Thomas 1992; Galetto 1997). Throughout the evolution to Asclepiadoideae there was loss of the disk and relocation of the nectar production function to nectariferous chambers inside the gynostegium (Endress and Stevens 2001; Christ and Schnepf, 1985; Galetto, 2006; Galil and Zeroni, 1965). These stigmatic nectaries are regarded as the primary nectaries in Asclepiadoidea. In *Marsdenia megalantha* we verified a new substitution, with the production and accumulation of nectar as reward being transferred to secondary nectaries in the anther skirt.

Vogel (1997) named as remarkable substitutive nectaries those that appear in flowers whose ancestral group lost the functionality of their original nectaries. Generally, they arise in non-homologous structures, but have a similar role to the lost past nectaries (Vogel 1997, 1998a; 1998b; Lopes et al 2002). Here, we find that the secondary nectaries of *M. megalantha* occur in diffuse anatomically undifferentiated secretory spots. In this way, they can be treated as nectarioles, term coined by Vogel (1998) for small indefinite areas that produce nectar. Thus, we recorded a very particular case function transference from a substitutive nectary to another one.

Differences in the functioning of these nectaries are the main factor to characterize this substitution, which seems to be advantageous for flower pollination. In most species of Asclepiadoideae, there is a single nectary type in the stigmatic chambers which is responsible both for the secretions that stimulate the pollen germination, and for those that serve as a floral reward, although the nectar usually flows through capillary ducts to nectar containers in places of the flower other than where they are produced (Galetto, 2006; Kunze, 1997; Vieira et al, 2012; Wiemer et al., 2011). Differently, in *M. megalantha* the primary nectar apparently lost its function of producing rewards, which became the exclusive function of the secondary nectaries under the anther skirt. The advantage of separating such functions in different secretory structures becomes clear in the face of following conflicting demands: if, on one hand,

working only at night would impair the development of pollen tubes that take about 48 hours to reach the ovules (Vieira et al., 2012). However, it is important to note that pollinators are attracted only at night when odor is released, a common condition in species of Marsdenieae (Altenburger and Matile, 1988; Pott et al.; 2002). Another advantage would be the eventual production of specific compounds in each type of nectar, since pollen germination has specific demands that are different or eventually conflicting pollinator attraction demands (Wunnachit et al., 1992; Christ and Schnepf 1985).

Noctuid-specialized pollination

Despite their high floral complexity, Asclepiadoideae include species with different levels of generalization in the pollination system. This occurs in phenotypic, functional and ecological terms (Ollerton et al 2007, Ollerton and Liede 1997, Wolff et al 2008). In *M. megalantha*, the ability to specifically attract nocturnal visitors ensures an evident phenotypic specialization. On the other hand, its adjustment to Noctuids supports functional specialization. The anther skirt and its substitutive nectaries are apparently essential for these levels of specialization, since they control the period of reward availability to the pollinators and the mechanical adjustment to pollinators. Ecological specialization requires the study of greater number of populations for it to be confirmed.

Carefull attention must be taken in extrapolating the specialized pollinating system results of *M. megalantha* to other species of Marsdenieae tribe. However, the features that ensure the pollination by moths in this species are common in the group. This is the case of nocturnal emission of sweet odor, presence of open or campanulate pendulous corollas, fleshy corona, and anther skirt with secondary nectaries that intensify the nectar production at night (Altenburger and Matile, 1988; Kunst and Wanntorp, 2008a; Pott et al., 2002).

There are others accurate record of pollination by noctuids in Marsdenieae for *Hoya*, (Foster 1992; Mochizuki et al 2017). In fact, Mochizuki et al 2017 Suggests that the transport of poliarium on the legs of noctuideos is common in the genus due to the morphological similarity between its flowers. It is possible that pollinaria attachment on legs in this Marsdenieae is a strategy to ensure pollination effectiveness, since

attachment to the probosces of these lepidopterans may not be the most effective may for pollen deposition in any cases (Barrios et al, 2016). We believe that much of this process owes the functionality of the anther skirt, since it is common to maintain a floral structure in a taxonomic group when it is associated with a group of specialized pollinators (Anderson, 1979; Fenster et al, 2004; Fenster and Rodríguez, 2007). In this context, the genus *Hoya* stands out for having the most evident anther skirts of the whole tribe (Kunze and Wanntorp, 2008a).

System efficiency

Marsdenia megalantha is pollinator dependent. In addition, since pollen is packaged in only five units per flower (pollinaria) each of which can deliver only two pollen loads (this means only 10 opportunities to donate pollen loads per flower) pollen transfer between flowers seems to be particularly sensible to efficiency of the pollination mechanism (Cruden 1977; Endress 2001). Spontaneous self-pollination seldom occurs in the Asclepiadoideae due to a strong herkogamy which requires pollinators for reproduction (Endress, 1996; Webb and Lloyd, 1986; Yamashiro and Maki 2005). The post-pollination process is very efficient since the proportion of pollinated flowers is similar to fruit set. However, only half of the ovary develops as only one pollinium is deposited per flower (Vieira et al, 2012). The efficiency of *M. megalantha* can be considered satisfactory if we take into account the results obtained with other South American Asclepiadoideae (Krings, 1999; Wiemer et al., 2011; Willson and Rathcke, 1974; Wolff et al., 2008). It is undeniable that the anther skirts and its secondary nectars are fundamental to the functioning of the system, but so far we do not know how directly it affects the efficiency. In the future, new studies comparing fitness among species of the group with different configurations of this structure, or the effect of intra-specific variation (La Rosa and Conner, 2017) can corroborate this hypothesis.

Conclusion

If we resort to the metaphor of considering the revolute margins of Marsdenieae anthers as "skirt" we may further speak of this structure as a "fashion trend" in the

functional specialization for pollination in the Marsdenieae tribe. Here, we draw attention to the mechanical function of the anther skirt that promotes a suitable flower-pollinator fit. Moreover, we show for the first time how its substitutive nectarioles allow for a split in nectar functions, *i.e.* aid for pollen germination and pollinator reward. These characteristics are essential in the specialized noctuid pollination of *Marsdenia megalantha*. We suggest that features associated to noctuid pollination in this species may be applicable to other species of the tribe.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thanks to PELD-Catimbau (Programa de Pesquisa Ecológica de Longa Duração), CNPq 459485/2014-8 (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) that supported this research; to RPPN - Almas (Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Almas) and Roberto Lima for the granting the place for research and field logistics; to Adriana Perez and Alejandra Trenchi for the technical support; and Alexander von Humboldt Foundation for the donation of optical equipment.

LITERATURE CITED

- Altenburger, R., and P. Matile. 1988. Circadian rhythmicity of fragrance emission in flowers of *Hoya carnos* R. Br. *Planta* 174: 248-252.
- Anderson, W. R. 1979. Floral Conservatism in Neotropical Malpighiaceae. *Biotropica* 11: 219-223.
- Andrade, K. V. S. A., M. J. N. Rodal, M. D. F. Lucena, and A. P. S. Gomes. 2004. Composição florística de um trecho do Parque Nacional do Catimbau, Buíque, Pernambuco-Brasil. *Hoehnea* 31: 337-348.
- Araújo, L. D. A., Z. G. M. Quirino, and I. C. Machado. 2014. High specialisation in the pollination system of *Mandevilla tenuifolia* (JC Mikan) Woodson (Apocynaceae) drives the effectiveness of butterflies as pollinators. *Plant Biology* 16: 947-955.

Baranzelli, M., A. Sérsic, and A. A. Cocucci. 2014. The search for Pleiades in trait constellations: functional integration and phenotypic selection in the complex flowers of *Morrenia brachystephana* (Apocynaceae). *Journal of evolutionary biology* 27: 724-736.

Barrios, B., S. R. Pena, A. Salas, and S. Koptur. 2016. Butterflies visit more frequently, but bees are better pollinators: the importance of mouthpart dimensions in effective pollen removal and deposition. *AoB Plants* 8: plw001.

Campbell, D. R., N. M. Waser, and M. V. Price. 1996. Mechanisms of hummingbird-mediated selection for flower width in *Ipomopsis aggregata*. *Ecology* 77: 1463-1472.

Christ, P., and E. Schnepf. 1985. The nectaries of *Cynanchum vincetoxicum* (Asclepiadaceae). *Israel Journal of Botany*, 34: 79-90.

Cocucci A. A., S. Marino, M. Baranzelli, A. P. Wiemer, and A. Sérsic. 2014. The buck in the milkweed: evidence of male–male interference among pollinaria on pollinators. *New Phytologist* 203: 280-286.

Cruden, R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.

de Vattimo, I. 1984. Quatro novas espécies do Gênero *Jacaranda* Jussieu (Bignoniaceae). *Rodriguésia* 36: 79-83.

Domingos-Melo, A., T. L. Nadia, and I. C. Machado. 2017. Complex flowers and rare pollinators: Does ant pollination in *Ditassa* show a stable system in Asclepiadoideae (Apocynaceae)? *Arthropod-Plant Interactions* 11: 339-349

Endress, M. E., and W. D. Stevens. 2001. The Renaissance of the Apocynaceae sl: Recent Advances in Systematics, Phylogeny, and Evolution. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88:517-522.

Endress, P. K., and B. Steiner-Gafner. 1996. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers: Cambridge University Press.

Faegri, K. and L. van der Pijl. "The principles of pollination ecology. Pergamon." (1979).

Fallen, M. E. 1985. The gynoecial development and systematic position of *Allamanda* (Apocynaceae). *American Journal of Botany* 72: 572-579.

Fenster, C. B., and S. Martén-Rodríguez. 2007. Reproductive assurance and the evolution of pollination specialization. *International journal of plant sciences* 168: 215-228.

Fenster, C. B., W. S. Armbruster, P. Wilson, M. R. Dudash, and J. D. Thomson. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 35: 375-403.

Fishbein, M. 2001. Evolutionary innovation and diversification in the flowers of Asclepiadaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 603-623.

Forster, P. I. 1992. Pollination of *Hoya australis* (Asclepiadaceae) by *Ocybadistes walkerisothis* (Lepidoptera: Hesperiiidae). *Australian Entomologist* 19: 39-43.

Galetto, L. 2006. Morfología y anatomía floral en especies de Apocynaceae-Asclepiadoidea. *Kurtziana* 32:5-11.

Galil, J., and M. Zeroni. 1965. Nectar system of *Asclepias curassavica*. *Botanical Gazette* 126:144- 148.

Gould, S. J., and R. C. Lewontin. The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. 1979. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 205: 581-598.

Goyder, D., and G. Morillo. 1994. A new species of *Marsdenia* (Asclepiadaceae) from NE Brazil. *Asklepios* 63:18-20.

Guimarães, E., L. C. Di Stasi, and R. D. C. S. Maimoni-Rodella. 2008. Pollination biology of *Jacaranda oxyphylla* with an emphasis on staminode function. *Annals of botany* 102: 699-711.

Kearns, C. A., and D. W. Inouye. 1993. Techniques for pollination biologists: University Press of Colorado.

Kohn, J. R., S. W. Graham, B. Morton, J. J. Doyle, and S. C. Barrett. 1996. Reconstruction of the evolution of reproductive characters in Pontederiaceae using phylogenetic evidence from chloroplast DNA restriction-site variation. *Evolution* 50: 1454-1469.

Krings, A. 1999. Observations on the pollination biology and flowering phenology of Texan *Matelea reticulata* (Engelm. ex A. Gray) Woods. (Asclepiadaceae). *Madroño* 46: 155-158.

Kunze, H. 1997. Corona and nectar system in Asclepiadinae (Asclepiadaceae). *Flora*, 192: 175-183.

Kunze, H., and L. Wanntorp. 2008. Corona and anther skirt in *Hoya* (Apocynaceae, Marsdenieae). *Plant Systematics and Evolution*, 271: 9-17.

Kunze, H., and L. Wanntorp. 2008. The gynostegium of *Hoya spartioides* (Apocynaceae– Asclepiadoideae): A striking case of incongruence between molecular and phenotypic evolution. *Organisms Diversity and Evolution* 8: 346-357.

La Rosa, R. J., and J. K. Conner. 2017. Floral function: effects of traits on pollinators, male and female pollination success, and female fitness across three species of milkweeds (*Asclepias*). *American journal of botany* 104: 150-160.

Liede, S., and H. Kunze. 1993. A descriptive system for corona analysis in Asclepiadaceae and Periplocaceae. *Plant Systematics and Evolution* 185: 275-284.

Lopes, A. V., S. Vogel and I. C. Machado. 2002. Secretory trichomes, a substitutive floral nectar source in *Lundia* A. DC.(Bignoniaceae), a genus lacking a functional disc. *Annals of Botany* 90:169-174.

Morillo, G. 1978. El género *Marsdenia* en Venezuela, Colombia y Ecuador. *Acta Botánica Venezuéllica* 13: 23-74.

Nilsson, L. A. 1988. The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* 334:147-149

Ollerton, J., A. Killick, E. Lamborn, S. Watts, and M. Whiston. 2007. Multiple meanings and modes: on the many ways to be a generalist flower. *Taxon*, 56: 717-728.

Ollerton, J., and S. Liede. 1997. Pollination systems in the Asclepiadaceae: a survey and preliminary analysis. *Biological Journal of the Linnean Society* 62: 593-610.

Ollerton, J., and S. Liede. 2003. Corona structure in *Cynanchum*: linking morphology to function. *Ecotropica* 9:107-112.

Omlor, R. 1998. Generische Revision der Marsdenieae (Asclepiadaceae). Ph.D. dissertation. University of Kaiserslautern, Kaiserslautern, Alemanha.

Pauw, A. 1998. Pollen transfer on birds' tongues. *Nature* 394:731-732.

Possobom, C. C. F., E. Guimarães, and S. R. Machado. 2015. Structure and secretion mechanisms of floral glands in *Diplopterys pubipetala* (Malpighiaceae), a neotropical species. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 211: 26-39.

Pott, M. B., E. Pichersky, and B. Piechulla. 2002. Evening specific oscillations of scent emission, SAMT enzyme activity, and SAMT mRNA in flowers of *Stephanotis floribunda*. *Journal of Plant Physiology* 159: 925-934.

Prenner, G., R. M. Bateman, and P. J. Rudall. 2010. Floral formulae updated for routine inclusion in formal taxonomic descriptions. *Taxon* 59: 241-250.

Rapini, A., C. van den Berg, and S. Liede-Schumann. 2007. Diversification of Asclepiadoideae (Apocynaceae) in the new world. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 94: 407-422.

Rudall, P. J., and R. M. Bateman. 2002. Roles of synorganisation, zygomorphy and heterotopy in floral evolution: the gynostemium and labellum of orchids and other lilioid monocots. *Biological Reviews* 77: 403-441.

Shuttleworth, A., and S. D. Johnson. 2009. Palp-faction: an African milkweed dismembers its wasp pollinators. *Environmental entomology* 38: 741-747.

Singh, H. B., and B. Subramaniam. Field manual on herbarium techniques. National Institute of Science Communication and Information Resources, 2008.

speciesLink: Sistema de Informação Distribuído para Coleções Científicas
<http://www.splink.org.br/index?lang=pt>

Teixeira, S. P., E. L. Borba, and J. Semir. 2004. Lip anatomy and its implications for the pollination mechanisms of *Bulbophyllum* species (Orchidaceae). *Annals of Botany* 93: 499-505.

Thomas, V. 1992. Structure and biology of floral nectary in *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae). *Feddes Repertorium* 103: 357-361.

Velloso, A. L. 2002. *Ecorregioes propostos para o bioma da caatinga*. Instituto de Conservacao Ambiental The Nature Conservancy do Brasil; Recife; associacao Plantas do Nordeste.

Vieira, M. F., and R. Grabalos. 2003. Sistema reprodutivo de *Oxypetalum mexiae* Malme (Asclepiadaceae), espécie endêmica de Viçosa, MG, Brasil, em perigo de extinção. *Acta Botanica Brasilica* 17:137-145.

Vieira, M. F., R. S. Fonseca, and G. J. Shepherd. 2012. Morfologia floral e mecanismos de polinização em espécies de *Oxypetalum* R. Br. (Apocynaceae, Asclepiadoideae). *Revista Brasileira de Biociências* 10: 314-221.

Vogel, S. 1990. History of the Malpighiaceae in the light of pollination ecology. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 130-142.

Vogel, S. 1997. Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic perspectives. I. Substitutive nectaries. *Flora* 192:305-333

Vogel, Stefan. 1998. Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic perspectives: II. Nectarioles. *Flora* 193: 1-29.

Vogel, Stefan. 1998. Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic perspectives III. Nectar ducts. *Flora* 193: 113-131.

Wanntorp, L., A. Kocyan, R. van Donkelaar, and S. S. Renner. 2006. Towards a monophyletic *Hoya* (Marsdenieae, Apocynaceae): Inferences from the chloroplast trnL region and the rbcL-atpB spacer. *Systematic botany* 31:586-596.

Wanntorp, L., and H. Kunze. 2009. Identifying Synapomorphies in the Flowers of *Hoya* and *Dischidia* - Toward Phylogenetic Understanding. *International journal of plant sciences* 170: 331-342.

Webb, C., and D. G. Lloyd. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. *New Zealand journal of botany* 24: 163-178.

Whitney, H. M., L. Chittka, T. J. Bruce, and B. J. Glover. 2009. Conical epidermal cells allow bees to grip flowers and increase foraging efficiency. *Current Biology* 19: 948-953.

Wiemer, A. P., A. Sérsic, S. Marino, A. Simões, and A. A. Cocucci. 2011. Functional morphology and wasp pollination of two South American asclepiads (Asclepiadoideae– Apocynaceae). *Annals of botany* 109:77-93.

Willson, M. F., and Rathcke, B. J. 1974. Adaptive design of the floral display in *Asclepias syriaca* L. *American Midland Naturalist* 92: 47-57.

Wolff, D., U. Meve, and S. Liede-Schumann. 2008. Pollination ecology of Ecuadorian Asclepiadoideae (Apocynaceae): How generalized are morphologically specialized flowers? *Basic and Applied Ecology* 9: 24-34.

Wunnachit, W., C. Jenner, and M. Sedgley. 1992. Floral and extrafloral nectar production in *Anacardium occidentale* L.(Anacardiaceae): an andromonoecious species. *International journal of plant sciences* 153: 413-420.

Yamashiro, T., and M. Maki. 2005. A comparative study of the reproductive character and genetic diversity of an autogamous *Tylophora matsumurae* and its progenitor *Tylophora tanakae* (Apocynaceae-Asclepiadoideae). *Plant Systematics and Evolution* 256: 55-67.

4 MANUSCRITO A SER ENVIADO AO PERIÓDICO PLOS ONE - Chegando mais perto... a micromorfometria gera níveis de especialização fenotípica nas flores aparentemente generalistas de *Ditassa* (Asclepiadoideae, Apocynaceae)

Domingos-Melo, Arthur^{1*}; Wiemer, Ana Pía²; Cocucci, Andrea²; Nadia, Tarcila de Lima³; Machado, Isabel Cristina¹.

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva, Departamento de Botânica, UFPE, Recife – PE, Brasil

²Laboratorio de Biología Floral (IMBIV-CONICET-UNCba), Córdoba, Argentina,

³Núcleo de Biologia do Centro Acadêmico de Vitória, UFPE – Vitória de Santo Antão – PE, Brasil

*Autor correspondente: arthurdom.melo@gmail.com

Resumo

Apesar de serem flores mais morfológicamente complexas, as Asclepiadoideae (Apocynaceae) parecem não refletir tamanha complexidade em seus sistemas de polinização. Em alguns grupos da América do Sul prevalece um grande número de flores claras, pequenas e de acesso aberto visitadas por vários insetos. Por este motivo, as mesmas são consideradas generalistas. Todavia, é possível encontrar polinizadores preferenciais em muitas delas, embora o motivo desta predileção seja desconhecida. Neste trabalho, tentamos buscar na micromorfometria algum respaldo para esses distintos graus de especialização. Para tanto, realizamos medições detalhadas através de imagens obtidas com técnicas de microscopia óptica, cortes histológicos seriados e reconstruções 3D. Nossos resultados mostram que a micromorfometria pode explicar níveis de especialização fenotípica. No que diz respeito a capacidade do local de acúmulo de néctar quantidades ínfimas de néctar podem influenciar a atração dos polinizadores. Também corroboramos nossas expectativas sobre uma maior complexidade na epiderme das flores cujo os principais polinizadores as utilizam como plataforma de pouso. Trata-se de interessante registro de um substrato vivo sofrendo seleção frente ao tamanho dos animais que locomovem-se sobre ele, situação que geralmente ocorre ao contrário (animais adequam-se ao substrato).

Introdução

A cor, o tamanho e o formato das flores são os atributos mais facilmente percebidos pelos homens. Talvez por isso, tradicionalmente, estes sejam os traços mais considerados quando se discute a seleção fenotípica das flores [1-5]. Da mesma forma, a determinação de uma flor como generalista tradicionalmente utiliza a combinação: cor clara, tamanho pequeno e formato aberto [6-8]. Porém, nem sempre algum destes fenótipos reflete uma real generalização, podendo existir especialização funcional (quando há a formação de um grupo de polinizadores de um determinado taxon) ou mesmo ecológica (quando há uma ou poucas espécies polinizadoras) [9]. Em casos onde a morfologia não permite explicar a especialização, recorre-se geralmente a outros atributos imperceptíveis aos homens, como por exemplo a composição química do odor ou mesmo a impalatabilidade do néctar [10, 11]. Aqui, realizamos um regresso à morfologia como explicação para diferentes níveis de

especialização, todavia sob uma nova perspectiva. Desta vez, fizemos isso levando em conta o que não é perceptível aos olhos humanos: a morfometria em nível microscópico.

Um grupo de plantas no qual podemos encontrar essa dualidade: fenótipo generalista e especialização funcional ou ecológica é a subfamília Asclepiadoideae (Apocynaceae). Apesar de possuir morfologia peculiar considerada a mais complexa dentre as Eudicotiledôneas [6], nesta subfamília não há uma compreensão clara sobre a generalização ou especialização [12] e há uma vasta quantidade de representantes com flores claras, pequenas e abertas [13, 14] aparentemente generalistas. O estudo destas espécies tem cada vez mais identificado que a nível funcional e ecológico elas não são tão generalistas assim. Alguns exemplos são casos de polinização restrita à moscas ou pequenas moscas e abelhas em algumas espécies de Florestas Tropicais do Equador [15] e uma convergência na polinização por vespas em espécies da África [16, 17], mais recentemente, também expandida para algumas espécies da América do Sul [18].

Em área de Caatinga no Vale do Catimbau (Buíque – PE, Brasil) encontramos duas espécies de Asclepiadoideae (Apocynaceae) de *Ditassa* (*D. rothundifolia* e *D. Capillaris*), que, como as demais espécies deste gênero, possuem flores em comumente abertas, pequenas e de cores claras [14]. A primeira vista, estas flores parecem bastante semelhantes e as encontramos sendo visitadas por diversos insetos, compartilhando alguns grupos de polinizadores. Apesar disso, estas plantas diferem na produção de frutos, eficiência de polinização e principais polinizadores. Enquanto *D. rothundifolia* possui uma baixa eficiência e atrai como polinizadores alados principalmente pequenos dípteros, *D. capillaris* é mais eficiente e atrai principalmente vespas (Domingos et al. Dados não publicados). Aqui, nos propomos a verificar como os atributos da micromorfometria podem explicar tais distinções entre as espécies.

A primeira hipótese que testamos refere-se a apresentação de recurso, afinal estes são considerados os atrativos primários, pois são eles o real motivo das visitas às flores [7]. A micromorfometria entra nesta questão, pois como tratam-se de flores muito pequenas é impossível quantificar seu néctar utilizando as metodologias comuns [19]. Assim, nos restou utilizar como indicativo a medição da capacidade do local onde o néctar é acumulado e de suas estruturas secretoras. Nos questionamos sobre (1) como as estruturas ligadas ao acúmulo e a produção de recursos diferem entre as espécies? Nossa hipótese leva em conta a teoria do forrageamento ótimo que, de forma simplificada, aponta que um recurso só será atrativo se compensar os custos para obtê-lo [20-22]. Esta questão tem fortes implicações na seleção de

flores por seus visitantes [23]. Assim, nós esperamos que *D. rothundifolia* possuísse um menor volume na câmara nectarífera e nectários menos desenvolvidos do que *D. capillaris*. Tendo uma quantidade de néctar inferior, *D. rothundifolia* não seria tão atrativa para as vespas, que tem um corpo (e consequentemente uma demanda energética) bem maior, restringindo a maior parte das visitas na espécie aos pequenos dípteros.

Nossa segunda hipótese leva em conta o display floral que funciona como um atrativo secundário, capaz de advertir os polinizadores da presença do recurso [7]. Neste caso, questionamos: (2) como cada parte dos verticilos das flores diferem em tamanho e formato? Levando em conta a associação entre recurso e display floral [24], esperamos encontrar estruturas maiores e mais largas em *D. capillaris*, tornando-a mais atrativa e acessível. Outra questão também de nosso interesse foi a interação com a superfície da pétala. Sabemos que a medida que os organismos variam de tamanho sua percepção do ambiente é alterada [25, 26], premissa essa que, de forma geral, tem sido nomeada de hipótese do tamanho do grão e testada em diferentes organismos [27-29]. É possível levar essa percepção para a relação entre as flores de *Ditassa* e seus respectivos visitantes. Enquanto os pequenos dípteros interagem intimamente com as pétalas (pousando, andando e apoiando-se sobre elas) as vespas, por serem maiores, utilizam os ramos como suporte. Assim, questionamos: (3) como a superfície da pétala difere entre as espécies? Nossa hipótese foi que *D. rothundifolia* teria a superfície da pétala mais elaborada (maior rugosidade da epiderme abaxial e uma maior cobertura por tricomas na superfície adaxial), propiciando a interação com os pequenos dípteros.

Por fim, dada a alta especialização morfológica destas flores que demandam uma interação precisa com o corpo de seus polinizadores [15, 18, 30, 31]. consideramos importante verificar se existem ajustes aos distintos grupos de principais polinizadores. Assim, nos questionamos: (4) como as estruturas ligadas aos mecanismos de polinização diferem entre as espécies? Inicialmente, levamos em conta o tamanho dos insetos, mas também consideramos a eficiência gerada pelos mesmos. Desta forma, propomos que *D. capillaris* deveria possuir estruturas maiores e mais robustas, o que facilitaria a interação com animais maiores. Além disso, estas estruturas deveriam estar mais expostas que em *D. rothundifolia*, o que tornaria mais fácil tanto a remoção quanto sua deposição dos pacotes polínicos (polínias).

Material e métodos

Mecanismo de polinização em Asclepiadoideae

A principal característica das Asclepiadoideae são suas flores de estrutura muito peculiar, com três estruturas exclusivas: a coroa (um terceiro verticilo vegetativo), o ginostégio (formado pela complexa fusão entre androceu e gineceu) e o polinário (estrutura composta por duas polínias ligadas a um corpúsculo por caudículos). No ginostégio, as margens laterais das anteras se tocam e formam trilhos com uma ranhura entre eles. Nesta família, o néctar é secretado dentro da câmara estigmática, que se encontra no interior dos trilhos. Esta câmara possui este nome, pois é nela onde as polínias depositadas germinam e emitem tubos polínicos (função transferida do estigma para o androceu). Este néctar geralmente fica acumulado em um local diferente de onde é secretado chamado de câmara nectarífera. A polinização se dá quando uma polínia é inserida no interior destes trilhos. Para que isso ocorra, deve-se ter em mente que o polinário encontra-se acima do trilho e existe uma ranhura no corpúsculo contínua com a ranhura do trilho. Ao tentar tomar néctar, alguma parte do visitante fica presa ao trilho (pernas ou aparato bucal) e, para retirá-la, é necessário passar pela ranhura do trilho até o fim, chegando a ranhura do corpúsculo. Neste momento, o polinário é removido. Em uma outra visita o processo se repete, mas desta vez deixa-se uma polínia no interior do trilho [6, 18, 31].

Obtenção e processamento de imagens das flores

Coletamos as flores das duas espécies de *Ditassa* para análise no Parque Nacional do Catimbau – Pernambuco, Brasil. Para realizar as medições utilizamos várias imagens das flores obtidas por diferentes técnicas: estereomicroscopia, microscopia óptica, reconstrução em três dimensões (3D) e cortes histológicos seriados. Assim, além de imagens de caráter ilustrativo, para as análises estatísticas utilizamos por espécie e em cada técnica respectivamente: 12 flores, 10 polinários, seis pétalas e seis flores em cortes transversais. Ao final, todas as imagens das flores foram mensuradas quanto as dimensões de nosso interesse com auxílio do software ImageJ 1.47t.

Inicialmente fizemos fotos sob estereomicroscópio afim de retratar toda a morfologia externa das flores. Para tanto, fixamos as flores de ambas as espécies em álcool a 70% e as levamos para serem analisadas em laboratório. Sob o estereomicroscópio exploramos as flores e determinamos posicionamentos para fotografar as dimensões de nosso interesse. A partir de

então, fotografamos cada flor nos diferentes posicionamentos utilizando uma câmera Sony CCD-IRIS sobre um estereomicroscópio Leica M420. Também utilizamos flores conservadas da mesma forma para fazer a reconstrução 3D da superfície abaxial da pétala através de microscopia confocal em um Microscópio LEXT OLS4000 3D Laser. Para cada espécie preparamos lâminas com polinários imersos em glicerina e fotografamos em um microscópio Básico Leica CM E com uma câmera Cannon Power Shot acoplada por um adaptador Feldmann Wild Leitz.

Para os cortes seriados fixamos as flores em F.A.A (formaldehído1:ácido acético4:álcool1) à temperatura ambiente durante 48 horas. Em seguida, desidratamos as amostras em uma série alcoólica de: 60°, 70°, 80°, 90°, 95°, e 100°. Deixamos as amostra uma hora em cada concentração e por fim, de um dia para o outro, em butanol. Posteriormente, clarificamos as amostras com mudanças de xilol puro e as incluímos em Paraplast. Fizemos cortes seriados de 10 e 12 micros de espessura em micrótomo rotativo do tipo Minot. As secções foram coladas em lâminas sobre placa aquecedora em 36° com água e desparafinizadas com uma série decrescente de etanol até chegar em água destilada. Fizemos a coloração com Azul de Astra por 15 min e com Fucsina Básica por 1 min, fazendo lavagem com água destilada por cinco minutos após cada coloração. Passamos as amostras para etanol 50%, e após a secagem foram colocadas em xilol e montadas com Bálsamo Canadá Artificial.

Câmara nectarífera e nectários

Afim de calcularmos o volume aproximado da câmara nectarífera, levamos em conta que o néctar se acumula sob a forma de uma gotícula elipsoide a partir de nossas observações em campo e em laboratório. Deste modo, utilizando as fotos de estereomicroscópio, medimos a altura da câmara (a), sua largura (b) e seu comprimento (c). Em seguida aplicamos a formula para cálculo do volume do elipsoide ($\frac{4}{3} \pi abc$) e convertemos o volume para microlitros.

Para a espessura do tecido secretor, fizemos medições utilizando as fotos dos cortes histológicos seriados transversais. Nos mesmos cortes, também utilizamos como indicativo do tamanho deste tecido, seu comprimento em relação ao comprimento total da superfície interior da câmara estigmática.

Verticilos florais

Para medições de tamanho, consideramos a flor como um todo e cada um de seus verticilos capazes de influenciar na interação com os insetos. Assim, utilizando as fotos do estereomicroscópio realizamos medições do diâmetro das flores, comprimento e largura de pétalas e unidades de corona entre os trilhos e altura e largura do ginostégio. Para obter o formato destas estruturas calculamos as proporções comprimento/largura ou altura/largura, uma vez que quanto maior o valor obtido por estas proporções mais longilínea é a estrutura.

Superfície das pétalas

Sobre os tricomas, além de registrar os locais de ocorrência, orientação e tamanho (pequeno, intermediário, grande), medimos o quanto cobrem a superfície das pétalas. Para isso usamos fotos de estereomicroscópio. Nós circundamos os locais de ocorrência dos tricomas sobre as pétalas e calculamos a área coberta pelos mesmos, após isso, dividimos pela área total das pétalas e obtivemos a porcentagem coberta por tricomas.

Medimos a rugosidade das células abaxiais das pétalas através de reconstrução 3D. Para isso, utilizamos um índice de rugosidade adaptado de [32]. Este método consiste em dividir o tamanho original do contorno de uma superfície pela distância linear da mesma. Em nosso caso, fizemos dois transectos, um paralelo e outro perpendicular ao eixo da pétala, ambos com 256 μm . Através da reconstrução 3d obtivemos a distância gerada pelo contorno do relevo sob cada transecto. Dividimos o contorno do relevo pela distância do transecto e obtivemos um índice de rugosidade, no qual quanto maior o valor, maior a rugosidade. Para cada pétala foi considerada a média dos índices obtidos com as medidas paralelas e perpendiculares.

Estruturas do mecanismo de polinização

Para determinar os tamanhos e formatos das estruturas relacionadas ao mecanismo de polinização, utilizamos tanto as fotos de estereomicroscópio como as dos cortes seriados. Nós medimos diferentes estruturas e dimensões presentes no polinário, sistema de câmaras estigmáticas e corpusculares e trilhos. Afim de quantificar o formato destas estruturas fizemos de forma semelhante às pétalas, coronas e ginostégio, ou seja, calculamos as proporções comprimento/largura ou altura/largura.

Resultados

Câmara nectarífera e nectários

O néctar das espécies de *Ditassa* fica acumulado em um local distinto de onde é secretado, constituindo, assim, uma câmara nectarífera. A câmara nectarífera é delimitada atrás pela parte basal do ginostégio, superiormente pelo trilho e câmara estigmática, e abaixo e dos lados pela corona (Figura 1). A parte da frente não possui delimitação e permanece exposta aos visitantes. Em *D. capillaris* a aba inferior da corona é maior, delimitando as laterais da câmara nectarífera e se apoiando sobre a pétala (Figura 1 - D); já em *D. rothundifolia*, esta aba é menor e não se apoia sobre a pétala (Figura 1 - C), sendo os lobos da corona a delimitação lateral da câmara. Todas as dimensões da câmara néctarífera são maiores em *D. capillaris*, em relação à *D. rothundifolia* (Tabela 1 /Figura 1 – A e B) o que resulta em um volume quase 13 vezes maior.

O nectário de ambas espécies de *Ditassa* fica localizado no interior da câmara estigmática, onde o néctar é produzido antes de ser conduzido à câmara nectarífera. O tecido secretor das espécies é semelhante (Figura 1 – E e F), tanto na estruturação (uma única camada de células epidérmicas secretoras) como na espessura (Tabela 1). Apesar de estender-se longitudinalmente por toda a câmara estigmática em cortes transversais é perceptível que este tecido ocupa proporções diferentes.

Verticilos florais

A flor como um todo não diferiu quanto ao diâmetro. Nas pétalas, não encontramos diferença no comprimento, já a largura foi maior em *D. capillaris*. As coronas são bastante distintas, pois a presença de apêndices filiformes é exclusividade de *D. rothundifolia*. Estes apêndices são retorcidos e se prolongam muito acima do ginostégio (Figura 2 – A e C). A ausência destas estruturas em *D. capillaris* nos fez optar por não mensurar a altura dos lóbulos das corolas, dada a impossibilidade de comparar tais estruturas. Nas demais dimensões, os lobos da corona de *D. capillaris* são mais largos que em *D. rothundifolia*, mas a situação se inverte no caso do comprimento que é maior em *D. rothundifolia*. Seus ginostégios também diferiram quanto altura e diâmetro, sendo ambas as dimensões maiores em *D. capillaris*. No que diz respeito ao formato, em todas as proporções: comprimento/largura de pétalas e

coronas e altura/diâmetro do ginostégio, *D. rothundifolia* teve valores maiores, o que garante às estruturas de suas flores um formato mais longilíneo. Estes dados nos permitem concluir que as flores de *Ditassa* possuem uma estrutura externa de tamanho semelhante graças à sua corola (Figura 2 – A e B), porém seus verticilos mais internos são bastante distintos, com um aspecto mais robusto em *D. capillaris* e mais esguio em *D. rothundifolia*, além da presença de apêndices (Figura 2 – C e D). Os valores destas medidas, bem como as informações sobre sua significância estatística estão presentes na Tabela 2.

Superfície das pétalas

D. rothundifolia tem $88 \pm 5\%$ da pétala coberta por tricomas, enquanto *D. capillaris* tem uma cobertura menor com apenas $70 \pm 8\%$ ($t=6.00$; $gl=17.59$; $p< 0.0001$). Percebemos uma distinção nos locais onde os tricomas ocorrem. Eles estão presentes em toda a pétala em ambas as espécies, exceto na margem em *D. rothundifolia*, e no centro em *D. capillaris*. Em *D. rothundifolia* também é possível perceber que os tricomas aumentam em tamanho à medida que estão próximos da câmara nectarífera e tornam-se orientados em sua direção. Já em *D. capillaris*, os tricomas parecem não variar de tamanho, nem ter uma orientação determinada (Figura 2 – C e D).

A superfície abaxial das flores de ambas as espécies segue padrões distintos. Enquanto em *D. capillaris* há um padrão visualmente semelhante à um solo quebrado e distribuído de forma uniforme, em *D. rothundifolia* encontramos uma aspecto ondulado irregular. Quanto à rugosidade, *D. rothundifolia* leva vantagem sobre *D. capillaris* (Figura 3). Em transectos lineares de $258.30 \mu\text{m}$, *D. rothundifolia* teve um contorno do relevo de $343.74 \pm 34.34 \mu\text{m}$, enquanto *D. capillaris*, na mesma distância, alcançou um contorno do relevo de apenas $305.06 \pm 24.03949 \mu\text{m}$. Estes valores resultaram nos respectivos Índices de Rugosidade: 1.33 ± 0.13 e 1.18 ± 0.09 , sendo estes valores distintos ($t=2.26$; $gl=10$; $p=0.02$).

Estruturas do mecanismo de polinização

As flores de *Ditassa* de ambas as espécies compartilham todas as estruturas presentes no sistema de trilhos, câmaras e polinários (Figura 4). Em uma vista lateral do ginostégio de ambas as espécies, vê-se a câmara nectarífera e acima dela a entrada alargada do trilho.

Superiormente, onde o trilho se encerra, encontra-se o corpúsculo, acima deste, por sua vez, encontra-se uma pequena protuberância encobrindo-o (Figura 4 – A e B).

Indo para o interior do trilho encontra-se uma câmara corpuscular. Continua a ela, mas separada por um estreitamento rígido de esclerênquima encontra-se uma outra câmara bem maior, a câmara estigmática (Figura 4 – E e G).. Em cada ginostégio estão dispostos de forma actinomorfa cinco destes complexos envolvendo trilhos e câmaras (Figura 4 – C e D) e acima de cada um deles há um polinário. Cada um dos polinários possui duas polínias elipsoides (dentro delas estão os grãos de pólen) unidas por um caudículo a um corpúsculo ovalado com uma ranhura no centro (Figura 4 – F e H). Antes de ser removido, o polinário fica incrustado no ginostégio com as polínias escondidas abaixo das abas das anteras (Figura 4 – I e J).

Na maior parte das medições, as estruturas foram maiores em *D. capillaris* do que em *D. rothundifolia*, ocorrendo o contrário apenas para largura da entrada do trilho, a protuberância que recobre a parte superior do polinário e a proporção altura/largura das partes que o compõe (corpúsculo e polínia). As únicas dimensões semelhantes entre as espécies foram a altura da polínia e as proporções entre comprimento e largura das câmaras e interior da ranhura do corpúsculo. Apresentamos os valores destas medidas, bem como as informações sobre sua significância estatística, na Tabela 3.

Discussão

De forma geral, a maior parte de nossas hipóteses foi corroborada. Assim, apesar de terem tamanhos capazes de gerar displays semelhantes, as flores diferem em diversas características micromorfológicas. *Ditassa capillaris* apresenta as estruturas associadas a apresentação de recurso bem mais desenvolvidos é mais acessível no acesso ao possuir verticilos maiores e mais largos. Já *D. rothundifolia* tem a superfície da pétala muito mais elaborada permitindo uma íntima interação com os visitantes florais. Aqui, discutimos como estas diferenças na micromorfologia auxiliam na compreensão de diferentes níveis de especialização em flores tão parecidas e aparentemente generalistas. Damos ênfase, sobretudo à superfície da pétala, uma vez que é a primeira vez que este atributo é utilizado para justificar uma especialização fenotípica. No que diz respeito às estruturas relacionadas aos mecanismos de polinização, tentamos, através da literatura e de nossas observações do mecanismo nas espécies de *Ditassa*, justificar a ausência de um padrão único na comparação entre as dimensões das duas flores.

Volume do néctar e sua apresentação na corona são determinantes

Há muito se sabe que volumes e concentrações de néctar possuem padrões de acordo com determinados grupos de polinizadores [33, 34]. Todavia, no que diz respeito ao volume, nos restringimos à dualidade entre muito e pouco néctar. Um exemplo disso é que levamos em conta o néctar copioso como indicativo da polinização por morcegos e aves [35, 36], mas negligenciamos pequenas quantidades de néctar como indicativos precisos de polinizadores. Um experimento levando em conta este atributo em pequenas flores de acesso aberto foi realizado por [9] que não constatarem mudanças no grupo de polinizadores visitantes, mas sim no tempo de visita. Sua abordagem, porém mediu um fator imediato, estes animais não passaram por um processo de aprendizagem afim de reconhecer atributos florais capazes que capacitassem a distinção entre os recursos [37]. Por outro lado, em nosso trabalho retratamos uma condição natural, sujeita a seleção e com padrões já estabelecidos. Ao calcular o volume das câmaras nectaríferas mostramos que mesmo as quantidades ínfimas de néctar das espécies de *Ditassa* podem variar bastante entre si, auxiliando em níveis micro a especialização. Uma vez que o padrão dos nectários é conservado nas Asclepiadoideae, mas a espessura e grau de desenvolvimento pode diferir entre as espécies [38]. Em nosso caso, ambas espécies de *Ditassa* possuem tecidos nectaríferos de espessuras iguais e de hipertrofia semelhante. Isso sugere semelhantes atividades metabólicas e mostra que a principal diferença entre os recursos é o volume.

O local onde o néctar é acumulado tem um papel fundamental na configuração assumida pelo polinizador durante a visita [39, 40]. Especificamente nas Asclepiadoideae essa afirmação é categórica. O local de acúmulo do néctar pode determinar o local onde os polinários serão depositados: se abaixo do trilha a tendência é uma deposição no aparato bucal, entretanto, se for na corona, espera-se a deposição nas pernas como é discutido por [31]. De fato, a maior parte dos polinários de ambas espécies de *Ditassa* foram encontrados nos aparatos bucais. Apesar de nessa subfamília ser comum sistemas complexos que conduzem o néctar para outras partes da corona, o que ocorre em nossas espécies é um sistema simples onde o néctar escorre diretamente, assim como descrito por [18] para *Morrenia*. Além disso, parece haver um padrão para cada tipo de polinizador. [15] apontam dois padrões distintos, um que favorecem principalmente pequenas moscas, e outro, abelhas. No primeiro caso, tratam-se de coronas abertas e néctar acumulado sobre abas da corola,

enquanto no segundo o néctar permanece em cavidades da corola. [18] estudando polinização por vespas, também encontraram néctar sem acesso livre, neste caso encoberto por uma corola que revestia quase ou totalmente o ginostégio. Neste trabalho encontramos o caso oposto, com o acesso livre ao néctar ocorrendo em associação com vespas e o acesso mais fechado com as moscas. Estes resultados mostram como é difícil determinar um padrão neste grupo e que cada caso deve ser analisado com cautela.

Como vimos neste trabalho, não há diferença entre o tamanho das flores, exceto pelas larguras das pétalas que sendo mais estreitas em *D. rothundifolia* facilitam a passagem das moscas entre suas superfícies abaxiais e adaxiais. De forma geral as principais diferenças de tamanho encontram-se na corola.[30] há muito já sugeriram que este verticilo era provavelmente o mais importante na determinação da forma de interação do polinizador. As coronas de *Ditassa* são os principais atributos que tem sido usados para determinação do gênero [14]. Em nosso caso, a configuração se mantém, sendo mais larga pode facilitar o acesso das vespas em *D. Capillaris*, enquanto em *D. rothundifolia*, apêndices, néctar mais escondido e estruturas mais alongadas podem favorecer a precisão na polinização por moscas, insetos conhecidos por serem polinizadores pouco eficientes [7].

Superfície da pétala com ajustes aos níveis de especialização

O estímulo tátil das pétalas e sua capacidade de propiciar atrito e assim facilitar o pouso e deslocamento dos polinizadores parece desempenhar papéis distintos na polinização da espécie de *Ditassa* estudadas. É importante levar em conta que a percepção tátil possui importâncias distintas para moscas e vespas, no contexto das *Ditassa*. Inicialmente, porque apenas as moscas pousam na flor, já que as vespas, por serem maiores pousam nos ramos. Outras evidências que apontam para uma maior importância tátil para moscas em detrimento de vespas são dadas por [41] que sugerem que pistas táctes são dispensáveis na polinização de *Ficus*, caso mais emblemático de polinização por vespa e por Millner, H.J. (dados não publicados) que demonstra a importância deste tipo de estímulo para moscas através de experimentos em orquídeas do gênero *Restrepia*. Ao corroborar nossa hipótese, encontrando uma superfície mais elaborada em *D. rothundifolia*, trazemos uma evidência a favor desta questão.

Outro aspecto interessante em nossa abordagem sobre a superfície das pétalas é que descrevemos um substrato (a flor) respondendo a seleção dos animais que apoiam-se sobre

ele. Os trabalhos com a hipótese do tamanho do grão geralmente mostram uma adaptação morfológica dos animais em favor do substrato, como por exemplo, a resposta na proporção perna/tamanho do corpo em formigas [27]. Aqui, mostramos um caso no qual esta hipótese também é válida no caminho contrário. Neste contexto, as pétalas possuem diferentes arranjos nos tricomas e na rugosidade, o que parece ser parte da explicação para os níveis de especialização presentes nas mesmas.

O fato de encontramos um padrão de tricomas muito mais organizado e de maior área em *D. rothundifolia*, cujos polinizadores pousam nas flores, é uma evidência em favor da funcionalidade dos tricomas como estímulo tátil e visual. Essa função é comumente sugerida para estas estruturas. Na própria subfamília Asclepiadoideae encontramos tricomas vibráteis que mimetizam pelos em *Boucerosia indica* [42] e há orquídeas miméticas que utilizam tricomas de forma parecida [43, 44]. Tricomas existentes nas pétalas mesmo sem função secretora podem auxiliar na polinização, dependendo de seu tipo e padrão de disposição [45]. Outros casos que chamam atenção são o complexo sistema de aprisionamento de moscas em flores-armadilhas de *Aristolochia* [46] e na própria subfamília Asclepiadoideae em *Ceropegia* [47] e o espalhamento de pólen sobre os tricomas aumentando da superfície em que ele é exposto aos polinizadores em *Antirrhinum* [48]. Os tricomas são um caráter muito comum nas flores de Metastelmatinae, clado de Asclepiadoideae ao qual pertencem as *Ditassas* [49] e acreditamos que eles devem ser considerados pistas importantes para entender casos de especialização.

Uma outra estrutura para qual é amplamente atribuída a função de estímulos táteis e também de atrito são as células cônicas, exclusivas das superfícies de algumas pétalas [50]. Estas células evoluem em flores cujos polinizadores necessitam de plataforma de pouso, mas também há exemplos de que podem retornar ao seu estado original, caso a seleção favoreça polinizadores que apenas pairam sobre as flores [51]. Os visitantes são capazes de reconhecer tais células e selecionam flores levando em conta esta característica mais do que outros atributos como a cor [52, 53]. Apesar de não conseguirmos identificar tais células em nossas flores, registramos superfícies das pétalas com relevos bem demarcados possibilitando a comparação de diferentes níveis de rugosidade. De forma análoga às células cônicas, estas rugosidades estão intensificadas em *D. Rothundifolia*, que tem pequenos dípteros que pousam sobre as pétalas como principais polinizadores, e, por outro lado, estão reduzidas em *D.*

capillaris, na qual as vespas são os principais polinizadores e apoiam-se sobre os ramos. Desta forma, ampliamos a questão do estímulo táctil do limite entre a existência de células cônicas para a consideração da superfície da pétala como um todo. Trata-se de outro traço a ser considerado em demais trabalhos com este grupo de plantas.

O mecanismo de polinização é o mesmo, mas algumas medidas precisam de ajustes

No geral, o mecanismo de polinização das *Ditassa* funciona de forma semelhante ao padrão conhecido para as Asclepiadoideae. Para promover a polinização nas espécies de *Ditassa*, é necessário acessar a câmara nectarífera, para no momento da retirada do aparato bucal, tê-lo conduzido pelo trilho. Este sistema permite a condução até os corpúsculos e a deposição das polínias. Neste sistema a principal distinção entre as duas espécies de *Ditassa* parece ser: i) o acesso às estruturas que, em *D. rothundifolia* é mais restrito e ii) o tamanho menor das estruturas relacionadas ao contato com o polinizador. O acesso mais restrito (apêndices da corona, estruturas do polinário mais alongadas, câmara nectarífera menor com a entrada do trilho menos exposta, apesar de mais larga, e corpúsculos mais escondidos pela protuberância da cabeça do estigma) pode intensificar o direcionamento do mecanismo, uma vez que as moscas parecem ser menos precisas em seus movimentos. Já os tamanhos menores de algumas estruturas podem ser uma resposta ao menor tamanho das moscas, pois ocorrem principalmente em parte associadas diretamente ao contato com o corpo do polinizador, como corpúsculos e câmaras. As proporções mantidas indicam principalmente a manutenção da estrutura básica do mecanismo. Estamos falando, portanto, de um mecanismo bastante complexo, no qual as estruturas envolvidas devem estar em um ajuste mútuo bastante preciso para garantir o seu sucesso [54].

Finalmente, outro ponto que vale a pena destacar, observado de forma exclusiva nas espécies deste estudo, é a constituição das câmaras. A presença de câmaras capazes de reter a polínia (câmara estigmática) e funcionar de guias até o corpúsculo (câmara corpuscular) já era conhecida [55]. A câmara corpuscular auxilia na condução da parte do polinizador (perna ou aparato bucal) ao corpúsculo, já a câmara estigmática retém eventuais polínias que já estejam presas ao polinizador. Entretanto, nas espécies de *Ditassa* aqui estudadas, as câmaras corpusculares não são formadas por projeções do tecido da parte externa do trilho como é mais comum [18], mas sim por um espessamento de lignina no interior da câmara estigmática. Assim, tratam-se de estruturas análogas, porém de origens distintas. Essa convergência

ênfatisa a necessidade de existéncia de uma pequena câmara capaz de guiar o polinizador à fenda do corpúsculo. Estudos nessa direção integrando outras espécies do gênero ou da tribo Metaltesminae podem corroborar nossa sugestão

Agradecimentos

Agradecemos à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível) pela bolsa de mestrado concedida; ao projeto PELD (Programa de Estudo de Longa Duração) Catimbau Pelas instalações e parte do financiamento de campo; à FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo auxílio de mobilidade discente concedida; ao LAMARX (Laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por Rayos da Universidade Nacional de Córdoba) pelas imagens em Lext; ao Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Nacional de Córdoba e às técnicas Adriana Pères e Alejandra Trenchi pelo desenvolvimento das técnicas histológicas; e ao LAVEG (Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco) pelas fotos de microscopia óptica.

Referências Bibliográficas

1. Caruso, C.M., *Competition for pollination influences selection on floral traits of Ipomopsis aggregata*. Evolution, 2000. **54**(5): p. 1546-1557.
2. Irwin, R.E. and S.Y. Strauss, *Flower color microevolution in wild radish: evolutionary response to pollinator-mediated selection*. The American Naturalist, 2005. **165**(2): p. 225-237.
3. Schemske, D.W. and H. Bradshaw, *Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (Mimulus)*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(21): p. 11910-11915.
4. Stanton, M.L., *Reproductive biology of petal color variants in wild populations of Raphanus sativus: I. Pollinator response to color morphs*. American Journal of Botany, 1987: p. 178-187.
5. Stanton, M.L., A.A. Snow, and S.N. Handel, *Floral evolution: attractiveness to pollinators increases male fitness*. Science(Washington), 1986. **232**(4758): p. 1625-1627.

6. Endress, P.K. and B. Steiner-Gafner, *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. 1996: Cambridge University Press.
7. Faegri, K. and L.v.d. Pijl, *The principles of pollination ecology*. 1979, Oxford etc.: Pergamon Press xi, 244p.-Illus.. Reproductive Biology (KR, 197909240).
8. Proctor, M., P. Yeo, and A. Lack, *The natural history of pollination*. 1996: HarperCollins Publishers.
9. Ollerton, J., et al., *Multiple meanings and modes: on the many ways to be a generalist flower*. *Taxon*, 2007: p. 717-728.
10. Johnson, S.D., A.L. Hargreaves, and M. Brown, *Dark, bitter-tasting nectar functions as a filter of flower visitors in a bird-pollinated plant*. *Ecology*, 2006. **87**(11): p. 2709-2716.
11. Shuttleworth, A. and S.D. Johnson, *The importance of scent and nectar filters in a specialized wasp-pollination system*. *Functional Ecology*, 2009. **23**(5): p. 931-940.
12. Ollerton, J. and S. Liede, *Pollination systems in the Asclepiadaceae: a survey and preliminary analysis*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1997. **62**(4): p. 593-610.
13. Liede, S. and U. Meve, *Revision of Metastelma (Apocynaceae-Asclepiadoideae) in Southwestern North America and Central America*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 2004: p. 31-86.
14. Rapini, A., *Six new species of Ditassa R. Br. from the Espinhaço Range, Brazil, with notes on generic delimitation in Metastelmatinae (Apocynaceae-Asclepiadoideae)*. *Kew Bulletin*, 2002: p. 565-583.
15. Wolff, D., U. Meve, and S. Liede-Schumann, *Pollination ecology of Ecuadorian Asclepiadoideae (Apocynaceae): How generalized are morphologically specialized flowers?* *Basic and Applied Ecology*, 2008. **9**(1): p. 24-34.
16. Ollerton, J., et al., *The pollination ecology of an assemblage of grassland asclepiads in South Africa*. *Annals of Botany*, 2003. **92**(6): p. 807-834.
17. Shuttleworth, A. and S.D. Johnson, *The Hemipepsis wasp-pollination system in South Africa: a comparative analysis of trait convergence in a highly specialized plant guild*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2012. **168**(3): p. 278-299.
18. Wiemer, A., et al., *Functional morphology and wasp pollination of two South American asclepiads (Asclepiadoideae–Apocynaceae)*. *Annals of botany*, 2011: p. mcr268.
19. Li, Z., J. Liu, and S. Huang, *A comparison of several methods used in the field for nectar collection and concentration analysis*. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 2005. **44**(3): p. 320-326.

20. Pyke, G.H., *Optimal foraging theory: a critical review*. Annual review of ecology and systematics, 1984: p. 523-575.
21. Pyke, G.H., H.R. Pulliam, and E.L. Charnov, *Optimal foraging: a selective review of theory and tests*. Quarterly Review of Biology, 1977: p. 137-154.
22. Zimmerman, M., *Plant reproduction and optimal foraging: experimental nectar manipulations in Delphinium nelsonii*. Oikos, 1983: p. 57-63.
23. Waddington, K.D. and L.R. Holden, *Optimal foraging: on flower selection by bees*. American Naturalist, 1979: p. 179-196.
24. Cohen, D. and A. Shmida, *The evolution of flower display and reward*, in *Evolutionary biology*. 1993, Springer. p. 197-243.
25. Levin, S.A., *The problem of pattern and scale in ecology: the Robert H. MacArthur award lecture*. Ecology, 1992. **73**(6): p. 1943-1967.
26. Morse, D., et al., *Fractal dimension of vegetation and the distribution of arthropod body lengths*. Nature, 1985. **314**(6013): p. 731-733.
27. Kaspari, M. and M. Weiser, *The size-grain hypothesis and interspecific scaling in ants*. Functional Ecology, 1999. **13**(4): p. 530-538.
28. Kotler, B.P. and J.S. Brown, *Environmental heterogeneity and the coexistence of desert rodents*. Annual Review of Ecology and Systematics, 1988: p. 281-307.
29. With, K.A., *Using fractal analysis to assess how species perceive landscape structure*. Landscape Ecology, 1994. **9**: p. 25-36.
30. Ollerton, J. and S. Liede, *Corona structure in Cynanchum: linking morphology to function*. Ecotropica, 2003. **9**: p. 107-112.
31. Vieira, M.F., R.S. Fonseca, and G.J. Shepherd, *Morfologia floral e mecanismos de polinização em espécies de Oxypetalum R. Br.(Apocynaceae, Asclepiadoideae)*. Revista Brasileira de Biociências, 2012. **10**(3): p. 314.
32. Luckhurst, B. and K. Luckhurst, *Analysis of the influence of substrate variables on coral reef fish communities*. Marine Biology, 1978. **49**(4): p. 317-323.
33. Galetto, L. and G. Bernardello, *Nectar sugar composition in angiosperms from Chaco and Patagonia (Argentina): an animal visitor's matter?* Plant Systematics and Evolution, 2003. **238**(1-4): p. 69-86.
34. Krömer, T., et al., *Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae*. Plant Biology, 2008. **10**(4): p. 502-511.

35. Baker, H.G., I. Baker, and S.A. Hodges, *Sugar composition of nectars and fruits consumed by birds and bats in the tropics and subtropics*¹. *Biotropica*, 1998. **30**(4): p. 559-586.
36. Tschapka, M., *Energy density patterns of nectar resources permit coexistence within a guild of Neotropical flower-visiting bats*. *Journal of Zoology*, 2004. **263**(01): p. 7-21.
37. Chittka, L. and J.D. Thomson, *Cognitive ecology of pollination*. Animal behaviour and floral evolution. Cambridge University Press, Cambridge, 2001.
38. Galetto, L., *Morfología y anatomía floral en especies de Apocynaceae-Asclepiadoidea*. *Kurtziana*, 2006. **32**(1-2): p. 5-11.
39. Nepi, M., et al., *Nectary structure and nectar presentation in Aloe castanea and A. greatheadii var. davyana (Asphodelaceae)*. *Plant Systematics and Evolution*, 2006. **257**(1-2): p. 45-55.
40. Pacini, E., M. Nepi, and J. Vesprini, *Nectar biodiversity: a short review*. *Plant Systematics and Evolution*, 2003. **238**(1-4): p. 7-21.
41. Chen, C. and Q. Song, *Responses of the pollinating wasp Ceratosolen solmsi marchali to odor variation between two floral stages of Ficus hispida*. *Journal of chemical ecology*, 2008. **34**(12): p. 1536-1544.
42. Płachno, B.J., P. Świątek, and G. Szymczak, *Can a stench be beautiful?—Osmophores in stem-succulent stapeliads (Apocynaceae-Asclepiadoideae-Ceropegieae-Stapeliinae)*. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 2010. **205**(2): p. 101-105.
43. Ascensão, L., et al., *Comparative structure of the labellum in Ophrys fusca and O. lutea (Orchidaceae)*. *American Journal of Botany*, 2005. **92**(7): p. 1059-1067.
44. Davies, K.L. and M. Stpiczynska, *Structure and distribution of floral trichomes in Lycaste and Sudamerlycaste (Orchidaceae: Maxillariinae sl)*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2010. **164**(4): p. 409-421.
45. Martin, C. and B.J. Glover, *Functional aspects of cell patterning in aerial epidermis*. *Current opinion in plant biology*, 2007. **10**(1): p. 70-82.
46. Oelschlägel, B., et al., *Structure and biomechanics of trapping flower trichomes and their role in the pollination biology of Aristolochia plants (Aristolochiaceae)*. *New Phytologist*, 2009. **184**(4): p. 988-1002.
47. Coombs, G., A.P. Dold, and C.I. Peter, *Generalized fly-pollination in Ceropegia ampliata (Apocynaceae–Asclepiadoideae): the role of trapping hairs in pollen export and receipt*. *Plant systematics and evolution*, 2011. **296**(1-2): p. 137-148.

48. Perez-Rodriguez, M., et al., *Development of three different cell types is associated with the activity of a specific MYB transcription factor in the ventral petal of Antirrhinum majus flowers*. Development, 2005. **132**(2): p. 359-370.
49. Liede, S. and U. Meve, *Taxonomic changes in American Metastelminae (Apocynaceae-Asclepiadoideae)*. Novon, 2001: p. 171-182.
50. Whitney, H.M., et al., *Why do so many petals have conical epidermal cells?* Annals of botany, 2011. **108**(4): p. 609-616.
51. Ojeda, I., et al., *Comparative micromorphology of petals in macaronesian lotus (Leguminosae) reveals a loss of papillose conical cells during the evolution of bird pollination*. International Journal of Plant Sciences, 2012. **173**(4): p. 365-374.
52. Glover, B.J. and C. Martin, *The role of petal cell shape and pigmentation in pollination success in Antirrhinum majus*. Heredity, 1998. **80**(6): p. 778-784.
53. Whitney, H.M., et al., *Conical epidermal cells allow bees to grip flowers and increase foraging efficiency*. Current Biology, 2009. **19**(11): p. 948-953.
54. Baranzelli, M., A. Sérsic, and A. Cocucci, *The search for Pleiades in trait constellations: functional integration and phenotypic selection in the complex flowers of Morrenia brachystephana (Apocynaceae)*. Journal of evolutionary biology, 2014. **27**(4): p. 724-736.
55. Kunze, H., *Structure and function in asclepiad pollination*. Plant systematics and evolution, 1991. **176**(3-4): p. 227-253.

TABELAS

Tabela 1 - Micromorfometria da câmara nectarífera e tecido secretor de néctar de *Ditassa capillaris* e *D. rothundifolia* (Asclepiadoideae – Apocynaceae). Flores coletadas no Vale do

		Ditassa rothundifolia	Ditassa capillaris	t	p
Câmara nectarífera	ALT	0.24±0.04mm	0.34±0.09mm	3.4592	0.0017
	LAR	0.22±0.03mm	0.78±0.08mm	21.2872	< 0.0001
	COM	0.17±0.04mm	0.48±0.11mm	9.3103	< 0.0001
	VOL	0.04±0.01µl	0.55±0.28µl	6.439	< 0.0001
Tecido secretor	ESP	12.56±0.74µm	12.63±158µm	0.093	0.927
	COM	454.95±44.33µm	223.39±11.62µm	13.2974	< 0.0001
	PCE	63±3%	59±4%	2.277	0.043

Catimbau – PE, Brasil.

(ALT – altura, LAR – largura, COM – comprimento, VOL – volume, ESP – espessura, PCN – porcentagem da superfície da câmara estigmática.)

Tabela 2 - Morfometria dos verticilos florais de *Ditassa capillaris* e *D. rothundifolia* (Asclepiadoideae – Apocynaceae). Flores coletadas no Vale do Catimbau – PE, Brasil.

		Ditassa capillaris	Ditassa rothundifolia	t	p
Flor	DIA	5.81±0.39mm	5.63±0.48mm	1.01	0.15
Pétalas (Corola)	COM	2.60±0.21mm	2.54±0.21mm	0.67	0.25
	LAR	1.41±0.12mm	1.23±0.11mm	3.63	<0.001
	PCL	1.85±0.15	2.07±0.14	3.53	<0.001
Lóbulos (Corona)	COM	0.31±0.07mm	0.55±0.05mm	9.56	<0.0001
	LAR	0.77±0.08mm	0.61±0.09mm	4.55	<0.0001
	PCL	0.40±0.06	0.91±0.11	14.55	<0.0001
Ginostégio	ALT	1.37±0.20mm	1.15±0.06mm	3.63	0.017

DIA	1.15±0.11mm	0.81±0.10mm	7.94	<0.0001	(DIA
PAD	1.19±0.11	1.43±0.16	4.38	<0.0001	–
					diâme

tro em μm ; COM – comprimento em mm; LAR – largura em mm; PCL – proporção comprimento/largura; ALT – altura em mm; PAD – proporção altura/diâmetro) Análise a partir de fotos com estereomicroscópio com n=12/sp.

Tabela 3 - Lista medições das estruturas relacionadas ao mecanismo de polinização de *Ditassa rothundifolia* e *D. capillaris* e valores dos testes estatísticos. Flores coletadas no Vale

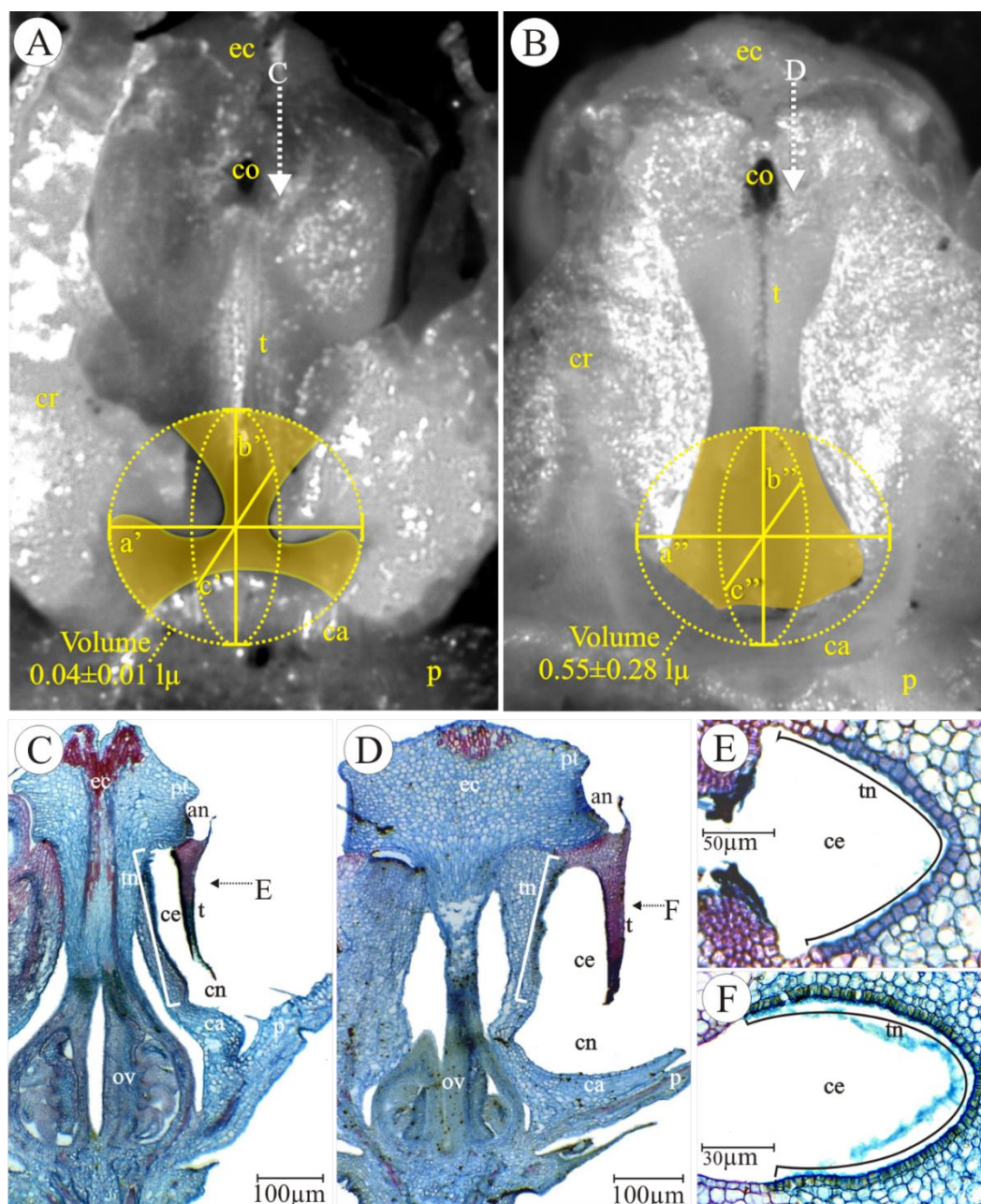
		<i>D. capillaris</i>	<i>D. rothundifolia</i>	<i>t</i>	<i>p</i>	do
Câmara corpuscular	COM ¹	55.85±15.23µm	32.60±8.94µm	3.27	0.008	Cati
	LAR ¹	76.80±12.70µm	58.02±7.39µm	3.18	0.008	mba
	PCL	0.76±0.29	0.58±0.20	1.32	0.2150	u –
Câmara estigmática	COM ¹	290.75±31.77µm	131.13±7.51µm	12.88	<0.001	PE,
	LAR ¹	247.30±67.54 µm	141.97±9.39µm	4.08	0.0064	Bras
	PCL	1.26±0.39	0.93±0.11	2.11	0.0728	il.
Passagem entre as câmaras¹		49.60±7.01	27.68±7.51	5.44	<0.001	
Trilho	ALT ²	0.72±0.06mm	0.62±0.06mm	4.28	<0.001	
	LAR ²	0.12±0.04mm	0.16±0.03mm	3.25	0.0036	
Polinário	ALT ³	0.36±0.03µm	0.28±0.02µm	8.07	<0.001	
	LAR ³	0.45±0.03µm	0.26±0.01µm	17.74	<0.001	
	PAL	0.81±0.11	1.07±0.08	5.96	<0.001	
Corpúsculo	ALT ³	0.23±0.01µm	0.13±0.01µm	21.19	<0.001	
	LAR ³	0.13±0.01µm	0.06±0.01µm	17.20	<0.001	
	COM ¹	124.72±10.92µm	78.02±12.34µm	7.24	<0.001	
	PAL	1.79±0.15	2.04±0.23	2.80	0.0118	
Parte superior do corpúsculo encoberta²		60±10%	80±21%	2.94	0.096	
Ranhura do corpúsculo	COM ¹	90.20±8.66µm	55.33±4.32µm	8.92	<0.001	
	LAR ¹	67.95±9.90µm	32.90±5.95µm	7.55	<0.001	
	PCL	1.36±0.27	1.73±0.37	2.13	0.0556	

Caldículo³		0.12±0.01µm	0.09±0.01µm	7.88	<0.001	
Polínia	ALT ³	0.21±0.02µm	0.20±0.01µm	1.35	0.1922	
	LAR ³	0.12±0.01µm	0.07±0.01µm	12.91	<0.001	
	COM ¹	111.80±14.97µm	72.65±4.97µm	6.51	<0.000	(CO
	PAL	1.76±0.20	2.86±0.23	11.32	<0.001	M – com

primento em µm; LAR – largura em µm; PCL – proporção comprimento/largura; ALT – altura em µm; PAL – proporção altura/largura) Medições realizadas em fotos obtidas com ¹ cortes histológicos seriados transversais (n=6 em *D. rothundifolia* e n=7 em *D. capillaris*), ² análise sob esteromicroscópio (n=12/sp), ³ polinários imersos em glicerina e fotografados em microscópio óptico (n=12/sp).

FIGURAS

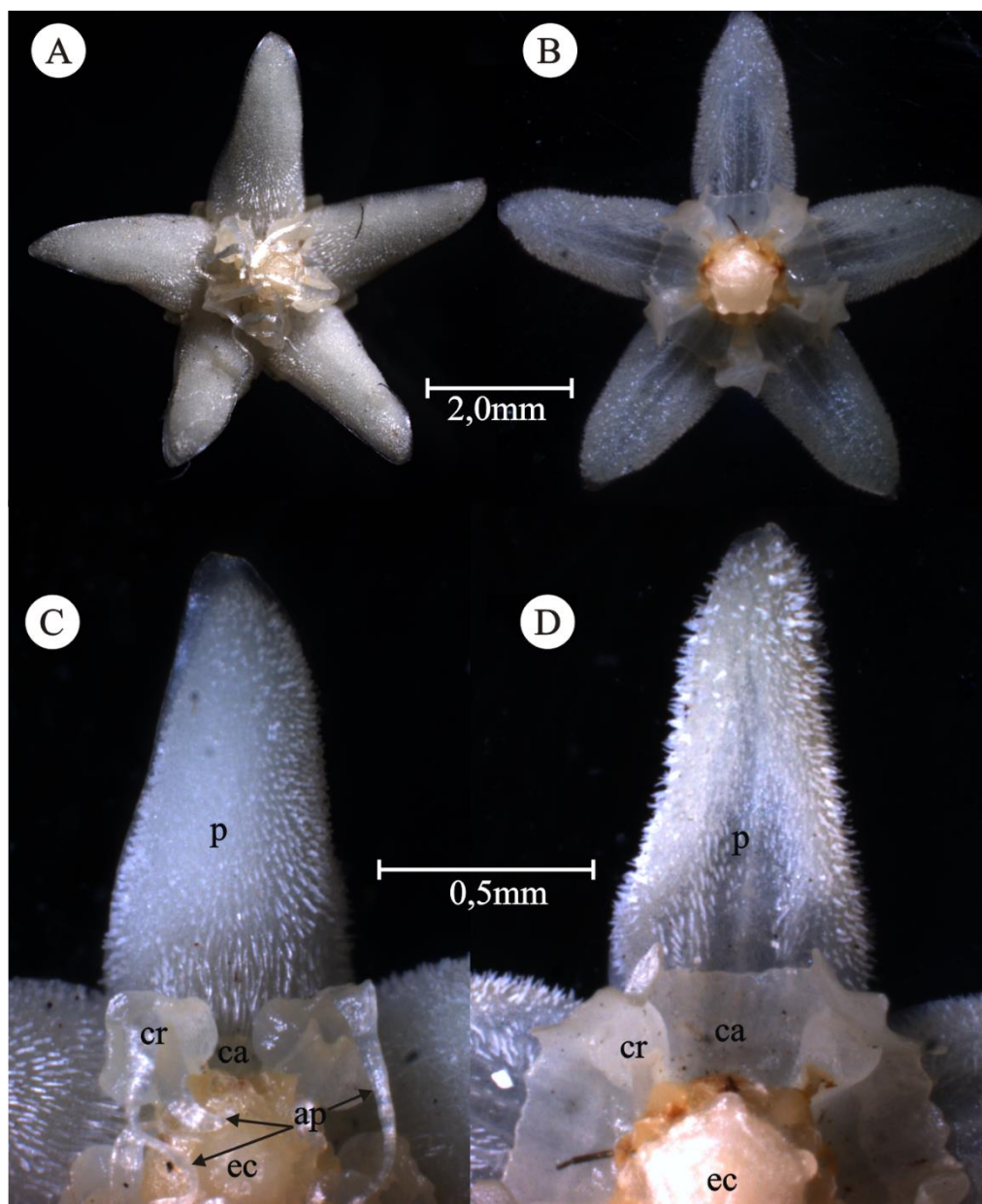
Figura 1 – Micromorfologia da câmara nectarífera e localização dos nectários de *Ditassa rothundifolia* e *D. capillaris*. Flores coletadas no Vale do Catimbau – PE, Brasil.



Vista lateral do ginostégio destacando em amarelo o local de acúmulo de néctar em *D. rothundifolia* (A) e *D. capillaris* (B). Secções longitudinais (C-D) marcadas em A e B com seta, mostrando local de secreção do néctar e câmara nectarífera. Secções transversais (E-F) marcadas em C e D com seta, mostrando comprimento, estrutura e espessura do tecido secretor nectarífero na câmara estigmática. Abreviaturas: dimensões da câmara nectarífera de

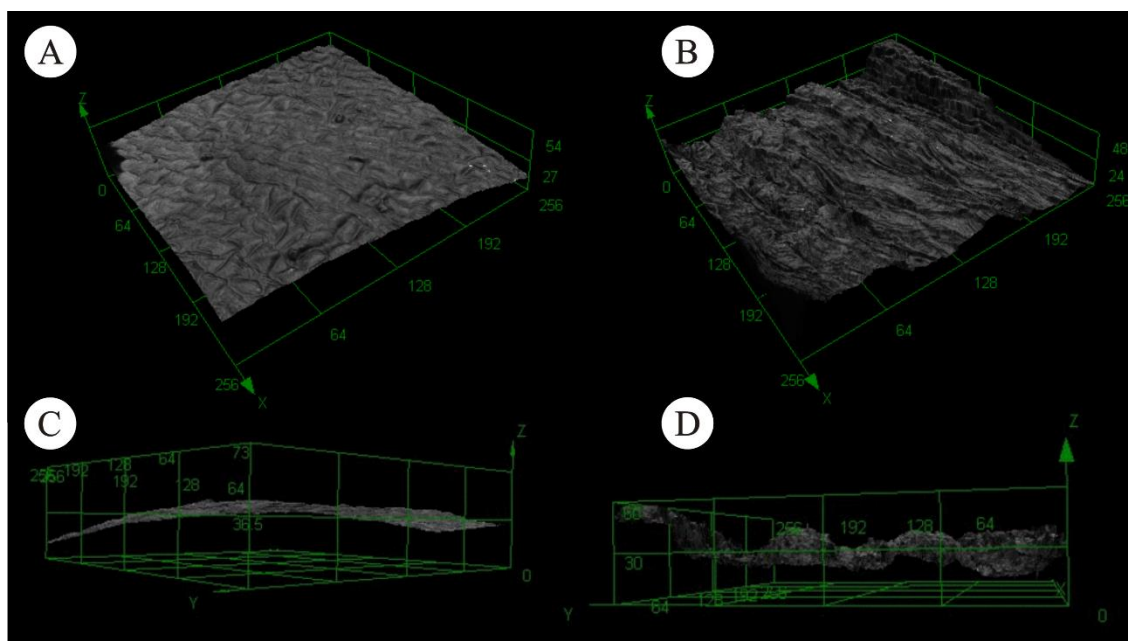
D. rothundifolia e *D. capillaris*, diâmetro/largura (a' e a''), diâmetro/altura (b' e b''), diâmetro/comprimento (c' e c''); cabeça do estilete (ec); corpúsculo (co); ovário (ov); interior da antera onde ficam as polínias (an); trilho (t); lobo da coroa (cr); aba inferior da coroa (ca); pétala (p); câmara estigmática (ce); câmara nectarífera (cn); tecido secretor nectarífero (tn).

Figura 2 – Flores de *Ditassa rothundifolia* e *D. capillaris* e detalhes dos verticilos. Flores coletadas no Vale do Catimbau – PE, Brasil.



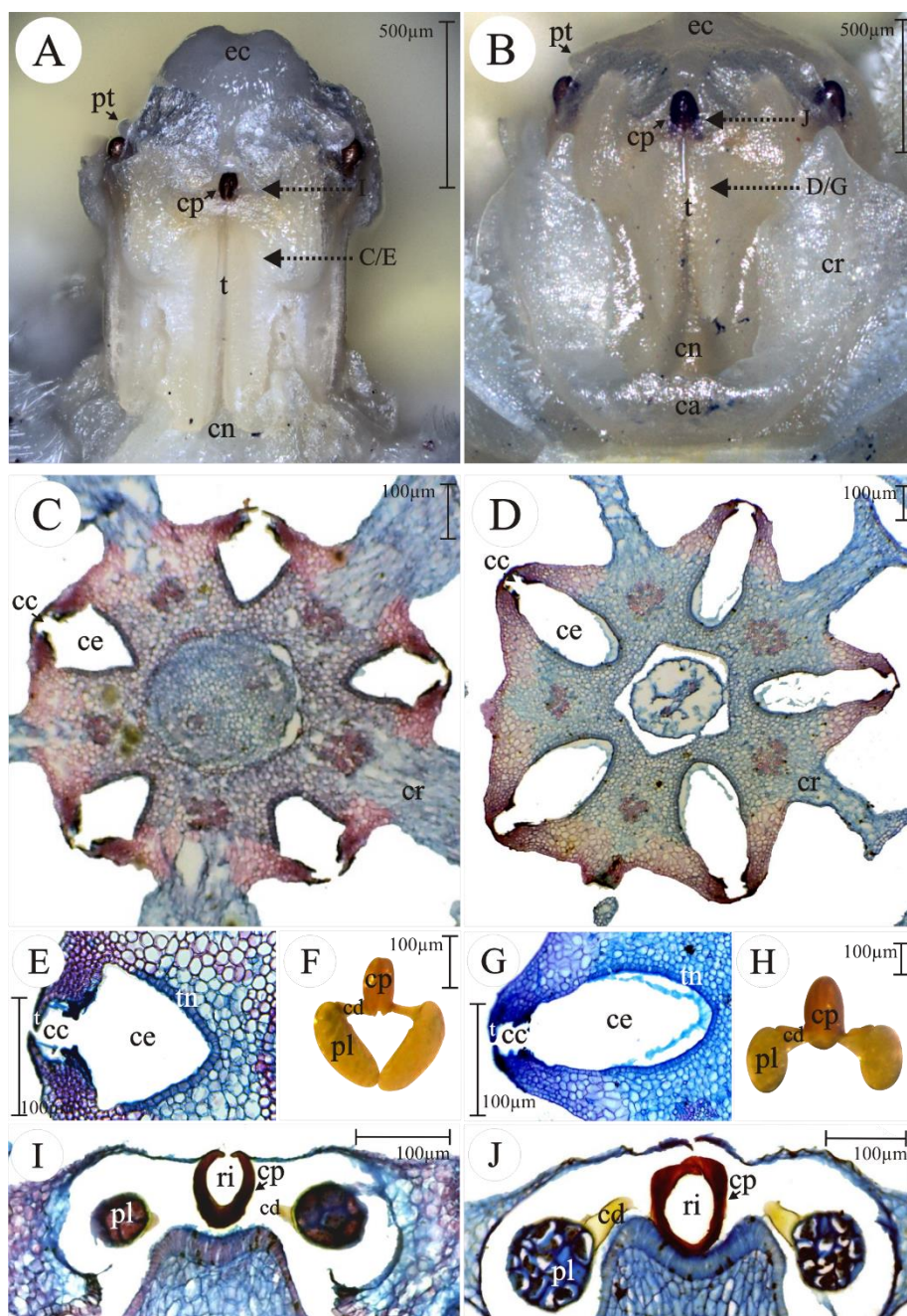
Flores de *Ditassa rothundifolia* (A) e *D. capillaris* (B) e suas imagens em detalhe evidenciando área coberta por tricomas na parte adaxial da pétala e a configuração da coroa (respectivamente C e D). Abreviaturas: pétala (p), lóbulo da coroa (cr), aba inferior da coroa (ca), apêndices da coroa (ap) cabeça do estilete(ec).

Figura 3 – Reconstrução 3d da superfície abaxial da pétala de *Ditassa capillaris* e *D. rothundifolia*. Flores coletadas no Vale do Catimbau – PE, Brasil.



Vista em perspectiva superior e ao nível da superfície da pétala. Respectivamente: A e C para *Ditassa capillaris*; B e D para *D. rothundifolia*. Os valores estão em micrômetros e as letras indicam os eixos (x, y e z).

Figura 4 – Estruturas associadas à polinização em *Ditassa rothundifolia* e *D. capillaris*



em Vista frontal do ginostégio em *Ditassa rothundifolia* (A – corona removida para facilitar visualização) e *D. capillaris* (B); corte transversal do ginostégio evidenciando conjunto de câmaras (respectivamente C e D); detalhe de câmara estigmática e câmara corpuscular (E e G); polinários completos (F e H); e corte transversal indicando configuração do polinário antes da remoção (I e J). Abreviaturas: cabeça dos estiletos (ec); protuberância da cabeça do estigma (pt); corpúsculo (cp); trilho (t); local da câmara nectarífera (cn); lobulo da cornona (cr); aba inferior da corona (ca); câmara corpuscular (cc); câmara estigmática (ce); caudículo (cd); polínia (pl); e ranhura interna do corpúsculo (ri).

**5 MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO ANIMAL BEHAVIOR -
Polinização por formigas em Asclepiadoideae (Apocynaceae): aptidão das flores ao
sistema e influência das histórias naturais destes polinizadores**

Domingos-Melo, Arthur^{1*}; Nadia, Tarcila de Lima ²; Machado, Isabel Cristina¹.

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva, Departamento de Botânica, UFPE, Recife – PE, Brasil

²Núcleo de Biologia do Centro Acadêmico de Vitória, UFPE – Vitória de Santo Antão – PE, Brasil

*Autor correspondente: arthurdom.melo@gmail.com

Resumo

A polinização por formigas é um sistema raro que ocorre em poucas espécies distribuídas em diferentes famílias. Um grupo de plantas onde há indícios deste sistema (observações de formigas como visitantes florais e removendo polinários) é Asclepiadoideae (Apocynaceae). As flores deste grupo são consideradas as mais complexas dentre as Eudicotiledôneas. Dada a raridade deste sistema de polinização e a complexidade destas flores, este trabalho buscou entender se é legítima a contribuição da polinização por formigas no grupo, que atributos das flores permitem este sistema e como a história natural das formigas interfere em seu serviço de polinização. Nós utilizamos como modelo duas espécies do gênero *Ditassa* encontradas em área de caatinga: *D. capillaris* e *D. rothundifolia*. Cada uma delas é polinizada por uma formiga, respectivamente, *Cephalotes* sp. e *Dorymyrmex thoracicus*, cada uma pertencente a um grupo funcionais distinto. Nossos resultados mostraram que as espécies de *Ditassa* possuem atributos que propiciam a polinização por formiga, dentre os quais: hábitos em consonância com os locais de forrageamento das formigas, tamanho da flor, fácil acesso ao recurso, pólen apresentado em polínias e resistência à secreção da glândula metapleurale das formigas. No que diz respeito às formigas, descobrimos que seus grupos funcionais podem auxiliar na previsão de sua atuação e efetividade como polinizadoras, mas a contribuição pode não ser tão distinta. Nossos resultados nos levam a crer que este sistema pode ser mais comum do que é atualmente conhecido.

Introdução

Polinização por formigas é um sistema raro e restrito a poucas espécies em diferentes famílias de Angiospermas (Rod Peakall & Beattie, 1991). Muitos estudos indicam motivos para tal raridade, como tamanho pequeno desses insetos, seu comportamento de autolimpeza e sua limitação no deslocamento (Faegri & Pijl, 1979), mas o principal deles é o comprometimento da germinação do pólen por secreções antibióticas existentes na glândula metapleurale (Beattie *et al.*, 1984; Wagner, 2000). Por outro lado, este sistema possui a vantagem de ter baixo custo energético (Hickman, 1974) e aproveitar-se da forte atuação das formigas quando polinizadores alados são escassos como em ambientes áridos (Gómez & Zamora, 1996) ou alpinos (Puterbaugh, 1998). Dentro desta demanda conflitante, este sistema evoluiu várias vezes e de formas distintas entre as Angiospermas havendo ajustes distintos

tanto nas flores, quanto nas formigas (Beattie, 2006). Observar como estes padrões se repetem nas flores nos permite vislumbrar como a convergência evolutiva atua (Faegri & Pijl, 1979; Fenster *et al.*, 2004; Fenster & Martén-Rodríguez, 2007; Tucker, 1997). Por outro lado, entender particularidades dos polinizadores nos permite traçar melhor sua repercussão sobre as flores (Niet & Johnson, 2012). Assim, o registro e análise de novos casos, sobretudo em novas famílias auxilia a compreender esta interação peculiar.

Em nossos estudos de biologia floral na Caatinga, com Asclepiadoideae, encontramos as formigas *Dorymyrmex thoracicus* e *Cephalotes* sp. polinizando respectivamente as flores de *Ditassa rhotundifolia* e *D. Capillaris*. Apesar de serem observados outros polinizadores, como outros himenópteros (alados), dípteros e lepidópteros, as formigas foram os únicos presentes em todos os dias de observações em campo e com um número de visitas notoriamente maior. As flores desta subfamília são consideradas as mais especializadas e funcionalmente complexas dentre as Eudicotiledôneas (Endress & Gafner, 1996). Apesar de existirem registros pouco claros e anedóticos da interação das formigas com suas flores (Tabela 1), esse é o primeiro trabalho em que a polinização por estes insetos foi realmente comprovada, uma vez que os demais descrevem apenas a remoção de polinários. Apesar de haver registro de polinização por formigas em orquídeas (Peakall & Beattie, 1989), outro grupo com flores morfológicamente complexas (Dressler, 1993; Mondragón-Palomino, 2008), a morfologia das Asclepiadoideae é totalmente peculiar. Assim, entender a participação da flor nesta interação nos traz uma nova perspectiva importante sobre polinização por formigas em flores complexas. Por outro lado, as duas espécies de formigas polinizadoras têm histórias naturais muito distintas (ver caracterização das espécies). Estes fatores levam a um interessante questionamento de como diferentes atributos morfológicos e funcionais de uma formiga podem influenciar na sua contribuição para a polinização.

Assim, buscamos caracterizar como cada parte envolvida, plantas e formigas, propiciam esta interação respondendo as seguintes perguntas: (1) que características das espécies de *Ditassa* propiciam a polinização por formigas?; (2) como as polínias de *Ditassa* reagem à secreção da glândula metapleurale?; como as espécies de formiga diferem quanto (3) quantidade de atuação, (4) comportamento de visita, (5) efetividade e (6) total de contribuição na polinização. Esperamos que as plantas tivessem atributos semelhantes ou análogos aos presentes em outras plantas polinizadas por formiga e tolerância a glândula metapleurale. Além disso, que *D. thoracicus* seria mais atuante, em detrimento de uma menor efetividade de polinização por serem menores e realizarem visitas rápidas, gastando mais tempo patrulhando

o recurso. Em contrapartida, haveria menor atuação por parte de *Cephalotes* sp, que seria mais efetiva dado seu comportamento mais lento e tamanho maior, capaz de acionar o mecanismo de polinização das Asclepiadoideae.

Materiais e métodos

Caracterização das espécies

As espécies *D. rothundifolia* e *D. capillaris* ocorrem em áreas de Caatinga e Cerrado. O mecanismo de polinização das Asclepiadoideae consiste em trilhos onde o visitante insere alguma parte do corpo (1- A) e ao tirá-la remove uma estrutura em forma de clipe (corpúsculo) que transporta dois sacos de pólen (polínias), a estrutura completa chama-se polinário (Figura 1 – B). O processo se repete na flor seguinte, mas desta vez, uma das polínias do polinário que estava preso ao animal fica retida no trilho (Figura 2 – B).

Com relação às formigas polinizadoras de *Ditassa*, estas pertencem a diferentes grupos taxonômicos e funcionais e estão presentes em diferentes extratos vegetais. *Dorymyrmex thoracicus* pertence a subfamília Dolichoderinae, caracterizada por sua dominância, registrando os principais casos de formigas invasoras (Andersen, 1995), o próprio gênero *Dorymyrmex* é considerado dominante, resultado de seu aproveitamento de energia térmica e metabólica, alta atividade e grandes colônias (Lach *et al.*, 2010). *D. thoracicus* é uma formiga pequena e está associada geralmente à serapilheira e solo (Vasconcelos *et al.*, 2006). Já o gênero *Cephalotes* é da subfamília Myrmecinae, um grupo funcional comumente generalista, não monopolizando recursos (Lach *et al.*, 2010). Esse gênero é essencialmente arborícola, mas é, por vezes, encontrado na serapilheira (Vasconcelos *et al.*, 2006). Um pouco maior, tem um corpo achatado dorso-ventalmente, fator que auxilia na manobrabilidade em queda livre (Yanoviak *et al.*, 2005).

Local de estudo

O Parque Nacional do Catimbau (PARNA Catimbau) possui o clima semiárido Bsh como predominante - escala de Köppen (Peel *et al.*, 2007). A temperatura média encontra-se entre 21°C e 25°C e a precipitação anual entre 650 e 1100 mm, oscilando muito entre os anos. Conduzimos os estudos em áreas de caatinga arbustiva (perenifólia, com elementos de

cerrado e de campos rupestres) e caatinga arbustivo-arbórea, (árvores e arbustos frequentemente contorcidos e com espinhos). A população de *Ditassa rothundifolia* estava associada a afloramentos rochosos em torno de 8°35'3,8'' O e 37°14'27,9'' S, com seus indivíduos incrustados nas fendas das rochas. Já a população de *D. capillaris* estava em áreas cobertas por Caatinga arbustivo-arbórea em torno de 8°32'1.0' O e 37°14'59.4 S'', os ramos de seus indivíduos apoiavam-se acima do dossel.

Comparação de atributos: espécies de Ditassa e demais espécies polinizadas por formigas

Afim de comparar as espécies de *Ditassa* com outras também polinizadas por formigas, utilizamos uma planilha de atributos florais elaborada levando em conta as classificações propostas por (Hickman, 1974) (descreveu o sistema de polinização de *Poligonum cascadenae* e listou pela primeira vez os principais atributos que garantem a polinização por formigas), por (Faegri & Pijl, 1979) (fizeram a primeira revisão sobre o tema), por (Peakall & Beattie, 1991) (que reuniu evidências a favor a polinização por formigas), por (Gómez *et al.*, 1996) (que reuniram os traços de espécies alpinas e de ambientes secos polinizadas por formigas), e por (Beattie, 2006) (que apresenta a mais recente revisão sobre o assunto). Assim, esperamos que na checagem destes atributos as espécies de *Ditassa* tenham alto percentual de atributos correspondentes aos sistemas de polinização por formigas. Obtivemos os atributos das espécies de *Ditassa* através de observações das plantas e flores em campo e análise de flores sob estereomicroscópio.

Experimentos de germinação de polínias expostas às formigas

Para verificar o efeito da glândula metapleural das formigas no comprometimento da germinação das polínias realizamos o seguinte tratamento, em ambas as espécies de *Ditassa*. Para cada uma das espécies, ensacamos botões florais em pré-antese durante a noite e na manhã seguinte, recolhemos as flores abertas e as transferimos para um meio de Agar-agar em caixas gerbox. Concomitantemente, capturamos as suas respectivas formigas em campo e as transportamos vivas para o laboratório em caixas de isopor. No laboratório, realizamos manualmente a autopolinização, porém adicionando o efeito das formigas (n=10/par formiga-planta). Para realizar a autopolinização em Asclepiadoideae é necessário remover o polinário e em seguida depositar uma das polínias do mesmo na câmara estigmática. Assim, após a remoção do polinário e antes de depositá-lo na câmara estigmática, friccionamos a polÍNIA na

região ventral da formiga viva. Em seguida deixamos as flores nas caixas gerbox por dois dias para a emissão dos tubos polínicos. Posteriormente, verificamos a formação de tubos polínicos através de microscopia de fluorescência (Martin, 2007) e registramos quantas flores tiveram tubos chegando até os óvulos.

Registro de comportamento de visitas

Observamos as visitas das formigas às suas respectivas flores afim de descrevê-las em detalhes quanto a interação entre a morfologia e estrutura floral e o comportamento das formigas. Além disso, repetimos essa observação de maneira sistemática afim de quantificá-la quanto ao número e duração de visitas. Procedemos da seguinte forma: tomamos uma formiga visitando uma flor aleatoriamente e a acompanhamos durante 15 minutos; nesse período registramos o número, duração total e individual das visitas. Repetimos esse procedimento várias vezes para cada par de formiga e planta (n=35 para *Dorymyrmex thoracicus* em *Ditassa rothundifolia*, n=20 para *Cephalotes* sp. em *D. capillaris*). Assim, calculamos o número de visitas/hora, o tempo médio de visita e tempo de visitas/hora para cada espécie de formiga/planta.

Registro de comportamento de visitas

Observamos as visitas das formigas às suas respectivas flores afim de descrevê-las em detalhes. Tal descrição foi realizada em duas etapas: uma descritiva, onde através de observação direta registramos detalhadamente a interação entre a morfologia floral e o comportamento das formigas e uma etapa quantitativa de observações sistemáticas, onde registramos número e duração de visitas. Para esta última, procedemos da seguinte forma: tomamos uma formiga visitando uma flor aleatoriamente e a acompanhamos durante 15 minutos registrando o número, duração total e individual das visitas. Repetimos esse procedimento várias vezes para cada par de formiga e planta (n=35 para *Dorymyrmex thoracicus* em *Ditassa rothundifolia*, n=20 para *Cephalotes* sp. em *D. capillaris*). A partir dos valores obtidos, calculamos o número de visitas/hora, o tempo médio de visita e tempo total de visitas/hora.

Quantificação de polínias transportadas e experimentos de polinização seletiva

Tomamos as formigas coletadas no item 3 e quantificamos o número de polínias aderidas a seus corpos e registramos os locais onde estas estavam presas. Assim, quantificamos os locais preferenciais de deposição de polínias nas diferentes espécies de formigas. Obtivemos também a razão de polínias transportadas por formigas.

Afim de quantificar a deposição de polínias por formigas, realizamos experimentos de polinização seletiva. Para cada uma das espécies de plantas, durante a noite, ensacamos individualmente botões florais em pré-antese em sacos de voal ($n=20/\text{sp}$). Na manhã seguinte, com as flores abertas, inserimos uma formiga viva no saco de voal. Obviamente, as formigas eram as respectivas espécies polinizadoras de cada planta, as quais nos certificamos de não possuir polínias aderidas. Após uma hora recolhemos as flores afim de quantificar o número de polínias removidas e depositadas; por fim, dividimos o número de polínias removidas pelo número de polínias depositadas e obtivemos a razão de deposição de polínias.

Contribuição ponderada de cada espécie de formiga na polinização

Estimamos o número de polínias depositadas por cada espécie de formiga para cada indivíduo de sua respectiva espécie de planta ($n=5/\text{sp}$), ponderando os valores de efetividade de polinização e atuação das formigas. Inicialmente, obtivemos um valor de atuação diária (AD) das formigas, ponderando a quantidade de horas de atuação (HA) diária da espécie, pelo número de formigas/ m^3 de ramo (FM) forrageando em cada indivíduo.

$$AD=HA.FM$$

Em seguida, estimamos a quantidade de polínias depositadas por cada formiga (PD), ponderando a média de polínias/formigas (PF) pela razão de remoção/deposição (RD) de polínias, que é uma constante em cada espécie de formiga.

$$PD=PF.RD$$

Por fim, ponderamos a atuação diária das formigas (AD) pelo número de polínias que cada formiga deposita (PD), obtendo um valor de deposição total (DT) de polínias em cada indivíduo de planta. Por fim, utilizamos a média de deposição total de cada espécie como uma estimativa do total de polinizações realizadas por dia em 1 m^3 de ramo.

$$AD . PD=DT$$

Resultados

Comparação de atributos: espécies de Ditassa e demais espécies polinizadas por formigas

Como pode ser visto na Tabela 2, a maior parte dos atributos nas espécies de *Ditassa* concordam com os padrões esperados para casos de polinização por formigas. A porcentagem de atributos concordando de forma total ou parcial foi de 85% em *Ditassa rothundifolia* e de 71% em *D. capillaris*.

Experimentos de germinação de polínias expostas às formigas

Em todas as flores de ambas as espécies de *Ditassa* foram observados tubos polínicos chegando nos ovários, indicando que, tanto no caso de *Dorymyrmex thoracicus* quanto em *Cephalotes* sp., a fricção sobre as polínias de suas respectivas flores não inibiu a emissão dos tubos polínicos.

Horário de atuação e número de formigas em forrageamento

As formigas da espécie *Dorymyrmex thoracicus* foram registradas em atividade sempre a partir do amanhecer (6:00 horas) até o crepúsculo (18:00 horas), totalizando 12 horas diárias. Já *Cephalotes* sp. tinha sua atividade restrita entre às 9:00 horas até às 17:00 horas, totalizando apenas oito horas diárias. Com relação ao número de formigas sobre os ramos, também encontramos diferença entre os pares de espécies: 277 ± 98 formigas/m³ de ramo em *Ditassa rothundifolia*, e apenas 63 ± 21 formigas/m³ de ramo em *D. capillaris* ($p=0.003$; $t=5.002$).

Comportamento de visitas

Ditassa rothundifolia

Os indivíduos de *Dorymyrmex thoracicus* patrulhavam os ramos de *Ditassa rothundifolia* de forma bastante veloz aproximando-se de diversas flores, porém visitando

apenas àquelas em melhor de aparência mais íntegra para tomar néctar. Em uma mesma visita, a formiga mudava de posição várias vezes afim de acessar cada uma das cinco cavidades entre os lóbulos da corola onde o néctar estava acumulado. Para trocar de posição a formiga dava voltas por trás do cálice e se deslocava entre as pétalas. *D. thoracicus* acessava o néctar de duas formas. A primeira delas era encostando o corpo sobre os apêndices da corola, apoiando suas pernas no ginostégio e nas pétalas e inserindo o aparato bucal na câmara nectarífera (Figura 2 - A). Desta forma, apenas as pernas eram capazes de remover ou depositar polínias, uma vez que os apêndices da corola impediam o contato com restante do corpo e o aparato bucal da formiga é muito pequeno para inserir-se no trilha. A outra forma de acesso era apoiando-se nas pétalas e ficando em frente ao trilha (Figura 2 - B). Nessa posição, as antenas podem remover polínias, pois são finas e longas o suficiente para inserir-se no trilha.

Ditassa capillaris

Por outro lado, os indivíduos de *Cephalotes* sp. ao patrulharem os ramos de *Ditassa capillaris* eram mais lentos e menos seletivos com as flores do que o observado para *Dorymyrmex thoracicus* em *Ditassa rothundifolia*. A forma de visita mais recorrente registrada em *Ditassa capillaris* se dava com as formigas encostando-se sobre a cabeça do estigma e apoiando as pernas sobre o ginostégio para inserir o aparato bucal na câmara nectarífera (Figura 2 - C). Nessa posição as polínias podiam ser depositadas sobre as pernas, sobre o aparato bucal (que nesta espécie tem tamanho suficiente para ser inserido no trilha) e na parte ventral do corpo, que apesar de não passar pelo trilha, conseguia remover polínias por fricção. Na outra posição as formigas acessavam a câmara nectarífera pela diagonal, apoiando-se nas pétalas (Figura 2 - D). Suas antenas são curtas e espessas, de modo que mesmo nesta posição não conseguiam inseri-las nos trilhos. Esta espécie de formiga também mudava de posição para acessar as cinco cavidades onde o néctar estava acumulado, porém fazia isso apenas movendo o corpo em torno do eixo da flor.

Comparação dos comportamentos de visita

A quantificação das visitas das duas espécies de formigas mostrou que houve diferença no comportamento (Tabela 3): *D. thoracicus* realizou mais visitas de períodos mais

curtos e *Cephalotes* sp. realizou menos visitas, porém de maior duração. De forma geral, a primeira espécie passa menos tempo visitando flores do que a segunda. Tanto para *Dorymyrmex thoracicus*, quanto para *Cephalotes* sp. não observamos interação antagônica com os demais visitantes florais. Havia uma maior restrição à polinização cruzada em *Ditassa rothundifolia*, pois seu hábito isolado dificultava o fluxo das formigas entre os indivíduos. Em *D. capillaris* essa restrição não existia, pois era comum indivíduos distintos terem ramos entrelaçados.

Quantificação de polínias transportadas e experimentos de polinização seletiva

A razão de polínias transportadas/formiga nos indivíduos de *Dorymyrmex thoracicus* coletados sobre *Ditassa rothundifolia* foi de $1/25 \pm 1/11$, já nos indivíduos de *Cephalotes* sp. sobre *D. capillaris* foi de $1/2 \pm 1/1$. Assim, é perceptível que a capacidade de remover polínias é bem maior no segundo par de espécies do que no primeiro ($p=0,0001$; $gl=2$; $G=30,27$). Também há diferença quanto aos locais de deposição no corpo das formigas (Tabela 4), sendo em *D. thoracicus* nas antenas e pernas e em *Cephalotes* sp. no aparato bucal, ventre e pernas (Figura 3).

No que diz respeito aos experimentos de polinização seletiva, registramos *Dorymyrmex thoracicus* depositando um terço das polínias que ela remove, enquanto *Cephalotes* sp. deposita um quarto das polínias que remove. Ainda assim, apesar dessa diferença não constatamos significância estatística entre estas razões de deposição de polínias ($p=0.93$; $gl=2$; $G=0,14$).

Cálculos estimativos da contribuição de cada espécie de formiga na polinização

Quando levamos em conta a atuação das formigas sobre a planta, encontramos que *Dorymyrmex thoracicus* forrageia sobre *Ditassa rothundifolia* quase sete vezes mais que *Cephalotes* sp. sobre *D. capillaris* (Figura 4, A). O que resulta em uma diferença significativa ($t=5.540$; $p=0.002$). Por outro lado, quando o parâmetro analisado é a efetividade geral de polinização a situação se inverte. Neste caso, *Cephalotes* sp. é seis vezes e meia mais eficiente que *Dorymyrmex thoracicus* (Figura 4, B), também resultando em uma diferença significativa ($t=4.653$; $p=0.002$). Ao final, quando ponderamos atuação e efetividade, ambas as espécies apresentam resultados semelhantes ($t=0.3111$; $p=0.3814$). Desta forma cada espécie contribui

de forma igual na polinização de sua respectiva planta (Figura 45, C): *Dorymyrmex thoracicus* depositando aproximadamente 66 ± 49 polínias por dia nas flores de *Ditassa rothundifolia* e *Cephalotes* sp. depositando 59 ± 22 polínias por dia sobre *D. capillaris*.

Discussão

A maior parte de nossas hipóteses foi corroborada. Ambas espécies de *Ditassa* apresentaram a maior parte de suas características comuns às aquelas conhecidas para a polinização por formigas, inclusive no que diz respeito a glândula metapleurale. As formigas responderam às expectativas para atuação e efetividade na polinização das duas *Ditassa*, exceto na contribuição final para o processo, que foi semelhante entre as espécies. Aqui, discutiremos as implicações dos atributos das Asclepiadoideae, sobretudo das Metastelmatinae (clado a que pertence *Ditassa*) na polinização por formigas. Nos aprofundaremos em como a biologia de cada formiga está relacionada à sua forma de interação com as flores e compararemos com o que é sugerido para formigas polinizadoras. Por fim, exploraremos as implicações das formigas que podem ser bem distintas, apesar de uma contribuição igual na polinização.

Por ser baixa e espalhar-se sobre a rocha, *D. rothundifolia* permite o acesso das formigas às flores. Por outro lado, um caso oposto ocorre em *D. capillaris*. É justamente seu hábito trepador que lhe torna acessível às formigas, dado que as mesmas, no seu caso, são arborícolas. Sabe-se que dada a locomoção limitada das formigas, em sistemas onde elas atuem como polinizadoras essa restrição é contornada permitindo o alcance às flores e o deslocamento entre indivíduos. Assim, se espera, para uma planta polinizada por formigas, tamanho pequeno (Hickman, 1974). Quanto ao fluxo polínico, este certamente é limitado nas *Ditassa* pelo grande número de flores por indivíduo. Tal situação favorece a geitonogamia, apesar da possibilidade de polinização cruzada, uma vez que os indivíduos de *D. rothundifolia* ocorrem em um mesmo afloramento e em *D. capillaris* os ramos de diferentes indivíduos se entrelaçam no dossel. Neste caso, temos o caminho oposto à (Hickman, 1974) que sugere, na polinização por formigas, indivíduos agregados e alta sincronia de floração, com poucas flores abertas por indivíduo. Ainda assim é importante levar em conta que como as *Ditassa* são autocompatíveis, mas não autógamas (Melo, Arthur Domingos, dados não publicados), mesmo com a geitonogamia as formigas colaboram para seu sucesso reprodutivo (Peakall & Beattie, 1989; Vega *et al*, 2009).

Ao observar os atributos florais, o padrão inconspícuo destas flores (cores claras, tamanho pequeno e fácil acesso ao recurso) é retratado como diagnóstico, não só para polinização por formigas, mas também por vespas (Ollerton *et al.*, 2003; Shuttleworth & Johnson, 2012; Wiemer *et al.*, 2011), por moscas (Faegri & Pijl, 1979; Proctor *et al.*, 1996) e por DPI (diversos pequenos insetos) (Bawa *et al.*, 1985; Machado & Lopes, 2004). De fato, *D. rothundifolia* é polinizada por diversos pequenos insetos, embora polinizada prioritariamente por moscas e em *D. Capillaris* o principal polinizador são vespas (A. D. Melo, Dados não publicados). A presença de um conjunto de polinizadores alados junto às formigas como polinizadores cursoriais é a condição mais comum (Beattie, 2006) e são justamente moscas e vespas, além de pequenas abelhas e outros pequenos insetos que geralmente compõem este conjunto de polinizadores alados (Peakall & Beattie, 1991; Vega *et al.*, 2009; Wyatt, 1981). Ainda assim, os sistemas mais restritos ocorrem em espécies que experimentam limitações na atração de polinizadores alados, seja por possuírem pouco recurso (Hickman, 1974) ou por estarem em um ambiente limitante (Gómez *et al.*, 1996; Puterbaugh, 1998), onde as formigas se mantêm por meio dos recursos florais (Rico-Gray, 1989). Como as espécies de *Ditassa* não experimentam estas condições tão abruptamente, para elas, não existe restrição à polinização por formigas.

A glândula metapleurale das formigas tem como sua principal função evitar o desenvolvimento de fungos (Beattie *et al.*, 1984; Beattie *et al.*, 1986). Trata-se de uma sinapomorfia que permitiu ao grupo explorar o solo, rico neste tipo de microrganismo. Todavia, é comprovado que sua secreção compromete a germinação dos grãos de pólen (Beattie *et al.*, 1984). Na polinização por formigas, alguns mecanismos podem driblar esse problema, como a deposição de grãos de pólen longe destas estruturas (Gómez *et al.*, 1996; Ramsey, 1995), ou mesmo o desenvolvimento de alguma resistência (Hull & Beattie, 1988). No nosso caso, encontramos uma resistência das polínias à secreção da glândula metapleurale das formigas. Alguns motivos são sugeridos na literatura para explicar tal resistência, como proteção mecânica fornecida pela película da polínia (Peakall & Beattie, 1989; Peakall & Beattie, 1991) ou uma real resistência do grão, porém nenhum deles foi realmente comprovado até hoje. Aqui, ainda sugerimos a possibilidade de que o dano aos grãos pode ser apenas parcial, sendo comprometida a função apenas dos grãos periféricos da polínia.

É notório que as espécies de *Ditassa* aqui estudadas elencam atributos que permitem a polinização por formigas. Ao considerar até onde podemos expandir estes dados é válido

levar em conta que ambas pertencem a tribo Metasltelmatinae (Rapini, 2002). Nesse grupo, não apenas os polínários e trilhos (característicos da subfamília), como também as corolas abertas e o padrão inconspícuo das flores são comuns (Wolff & Liede, 2008). Também é possível esperar que a resistência das polínias à glândula metapleurale se mantenha. Muitas destas espécies ocorrem no Brasil, em áreas de Cerrado e Caatinga uma vez que a América do Sul é seu centro de diversidade (Rapini, 2012), estes locais tem clima árido ou semi-árido (Peel *et al.*, 2007). Como estas espécies ou são volúveis formando pequenos arbustos decumbentes ou trepadeiras (Silva *et al.*, 2008) assim, estão expostas a formigas arborícolas ou terrícolas. A partir desta série de evidências, é bastante possível esperar que a polinização por formigas ocorra em mais espécies de Metasltelmatinae.

Os grupos funcionais das formigas realmente foram capazes de prever sua atuação nas respectivas flores. O comportamento dominante de *D. thoracicus* refletiu-se em um maior número de formigas por planta. Soma-se a isso o comportamento de recrutamento em massa presente no gênero (Torres-Contreras & Vasquez, 2007). Sua maior atividade e capacidade de aproveitar toda a energia térmica e metabólica (Torres-Contreras & Vasquez, 2004) permitiu que seu tempo de atuação diária também fosse maior. Por outro lado, *Cephalotes* so. tem um comportamento de forrageio solitário, diminuindo drasticamente sua atuação em comparação com *D. thoracicus*. Apesar disso, há indícios de que o padrão de forrageamento neste gênero é determinado a partir da colônia (Gordon, 2012), o que garante fidelidade ao recurso.

A busca mais seletiva por flores realizada por *D. thoracicus* pode estar associada ao seu comportamento de patrulhamento do recurso. Apesar das formas como as formigas visitavam as flores de *Ditassa* serem bastante semelhantes, seus diferentes tamanhos as impediram de colocar-se em posições semelhantes quando apoiadas nas pétalas. Além disso a própria morfologia da flor pode explicar parte dos movimentos. A presença de apêndices em *D. rothundifolia* impede um contato tão íntimo quanto em *D. capillaris*, o que força as formigas a se manterem mais afastadas e se moverem mais na flor. Já os fatores que podem estar relacionados aos diferentes tempos de visita, podem ser a velocidade com que as formigas tomam o néctar e a quantidade de recurso na flor. (Davidson & Snelling, 2004) apontam que as Dolicoderinae (Subfamília das *Dorymyrmex*) possuem maior desempenho para a sucção de líquidos, ao contrário de grupos nos quais é comum associação com pequenos insetos secretores, caso do gênero *Cephalotes* (Andrade & Urbani, 1999). Além disso *D. rothundifolia* possui uma menor quantidade de néctar por flor (A. D. Melo, Dados não publicados).

Como dito acima, muitas Asclepiadoideae são polinizadas por abelhas e sobretudo por vespas. Desta forma, não é de surpreender que formigas, que também são Hymenopteros, possam atuar como polinizadores (Beattie, 2006), mesmo em flores tão complexas como as Asclepiadoideae. A mesma afirmação pode ser feita sobre a polinização em orquídeas. No que diz respeito à precisão a polinização entre essas flores complexas: em Asclepiadoideae os trilhos regulam a deposição de polínias, de modo a evitar que polínias caiam do polinário, já em orquídeas o mecanismo de polinização é mais simples e é possível que as formigas depositem polínias sobre ramos e até plantas adjacentes (Peakall & Beattie, 1989). No que diz respeito a diferença no número de polínias removidas pelas formigas nas espécies de *Ditassa*, acreditamos que pode ser explicado pela forma e comportamento das visitas, por outro lado, a probabilidade de deposição da polínia ser semelhante atribuímos a precisão do mecanismo. Todavia a precisão do mecanismo é tamanha que as taxas de deposição permaneceram semelhantes.

Apesar das contribuições semelhantes no total de flores polinizadas, a maneira como essa polinização é obtida pode ter implicações muito distintas. Uma delas recai sobre a quantidade e qualidade do recurso oferecido pelas flores. É conhecido que formigas podem alterar a qualidade do néctar ao transportar leveduras que consomem parte dos açúcares (Vega & Herrera, 2013). A formiga *D. thoracicus* faz mais visitas por flor para alcançar um número de polinizações semelhante à *Cephalotes*, o que gera uma exploração de um número maior de flores e aumenta as chances deste néctar ser comprometido por leveduras. Por outro lado, ambas as formigas cumprem uma série dos requisitos propostos por (Beattie, 2006) para a evolução do sistema de polinização por formigas, tais como: não danificar órgãos reprodutivos, ser frequentes e abundantes, operar o mecanismo de polinização, não danificar o pólen com secreções metapleurais e ter ninhos perenes. Desta forma, acreditamos que não há motivos para sejam selecionadas estratégias capazes de evitar o acesso das formigas nestas flores. Esse é o primeiro passo para que o sistema se mantenha estável.

Podemos concluir, portanto, que as formigas atuam como um grupo cursorial que auxilia no sucesso reprodutivo das espécies de *Ditassa*, sobretudo com a geitonogamia e em associação com polinizadores alados. Quanto às flores, verificamos principalmente que além dos atributos comuns a esse sistema de polinização, o mecanismo de remoção e deposição de polinários peculiar às Asclepiadoideae pode ser um forte contribuinte na efetivação da polinização por formigas. Como há outras espécies muito semelhantes as *Ditassa* aqui estudadas, dentro das Metastelmatinae, podemos esperar que isso seja mais comum do que

conhecemos atualmente. Já sobre as formigas, percebemos que os grupos funcionais realmente podem explicar boa parte da maneira como se dá sua interação com as flores quanto a atuação e efetividade e geram implicações muito distintas (talvez sobre quantidade e qualidade de recurso). Apesar disso, ficamos surpresos com a contribuição equiparada na polinização de ambas as espécies de formigas. Essa situação invoca uma das questões mais básicas da ecologia: o fato de que diferentes espécies podem alcançar sucessos semelhantes, mesmo optando por estratégias opostas dentro da demanda conflitante que lhe é oferecida.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível) pela bolsa de mestrado concedida e ao projeto PELD (Programa de Estudo de Longa Duração) Catimbau Pelas instalações e parte do financiamento de campo.

Referências Bibliográficas

Andersen, A. N. (1995). A classification of Australian ant communities, based on functional groups which parallel plant life-forms in relation to stress and disturbance. *Journal of Biogeography*, 15-29.

Andrade, M. L., & Urbani, C. B. (1999). *Diversity and adaptation in the ant genus Cephalotes, past and present*: Staatliches Museum für Naturkunde.

Bawa, K. S., Bullock, S., Perry, D. R., Coville, R. E., & Grayum, M. H. (1985). Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination systems. *American Journal of Botany*, 346-356.

Beattie, A. J. (2006). The evolution of ant pollination systems. *Botanische Jahrbücher*, 127(1), 43-55.

Beattie, A. J., Turnbull, C., Knox, R. B., & Williams, E. (1984). Ant inhibition of pollen function: a possible reason why ant pollination is rare. *American Journal of Botany*, 421-426.

Beattie, A. J., Turnbull, C. L., Hough, T., & Knox, R. B. (1986). Antibiotic production: a possible function for the metapleural glands of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 79(3), 448-450.

Davidson, D. W., Cook, S. C., & Snelling, R. R. (2004). Liquid-feeding performances of ants (Formicidae): ecological and evolutionary implications. *Oecologia*, 139(2), 255-266.

Dressler, R. L. (1993). *Phylogeny and classification of the orchid family*: Cambridge University Press.

Endress, P. K., & Steiner-Gafner, B. (1996). *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*: Cambridge University Press.

Faegri, K., & Pijl, L. v. d. (1979). *The principles of pollination ecology*: Oxford etc.: Pergamon Press xi, 244p.-Illus.. Reproductive Biology (KR, 197909240).

Fenster, C. B., Armbruster, W. S., Wilson, P., Dudash, M. R., & Thomson, J. D. (2004). Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 375-403.

Fenster, C. B., & Martén-Rodríguez, S. (2007). Reproductive assurance and the evolution of pollination specialization. *International journal of plant sciences*, 168(2), 215-228.

Gómez, J. M., Zamora, R., Hódar, J. A., & García, D. (1996). Experimental study of pollination by ants in Mediterranean high mountain and arid habitats. *Oecologia*, 105(2), 236-242.

Gordon, D. M. (2012). The dynamics of foraging trails in the tropical arboreal ant *Cephalotes goniodontus*. *PloS one*, 7(11), e50472.

Hickman, J. C. (1974). Pollination by ants: a low-energy system. *Science*, 184(4143), 1290-1292.

Hull, D. A., & Beattie, A. J. (1988). Adverse effects on pollen exposed to *Atta texana* and other North American ants: implications for ant pollination. *Oecologia*, 75(1), 153-155.

Lach, L., Parr, C. L., & Abott, K. L. (2010). *Ant ecology*: Oxford University Press.

Machado, I. C., & Lopes, A. V. (2004). Floral traits and pollination systems in the Caatinga, a Brazilian tropical dry forest. *Annals of botany*, 94(3), 365-376.

Martin, C., & Glover, B. J. (2007). Functional aspects of cell patterning in aerial epidermis. *Current opinion in plant biology*, 10(1), 70-82.

Mondragón-Palomino, M., & Theißen, G. (2008). MADS about the evolution of orchid flowers. *Trends in plant science*, 13(2), 51-59.

Niet, T. v. d., & Johnson, S. D. (2012). Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(6), 353-361.

Ollerton, J., Johnson, S. D., CRANMER, L., & Kellie, S. (2003). The pollination ecology of an assemblage of grassland asclepiads in South Africa. *Annals of botany*, 92(6), 807-834.

Peakall, R., & Beattie, A. (1989). Pollination of the orchid *Microtis parviflora* R. Br. by flightless worker ants. *Functional Ecology*, 515-522.

Peakall, R., & Beattie, A. J. (1991). The genetic consequences of worker ant pollination in a self-compatible, clonal orchid. *Evolution*, 1837-1848.

Peel, M. C., Finlayson, B. L., & McMahon, T. A. (2007). Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and earth system sciences discussions*, 4(2), 439-473.

Proctor, M., Yeo, P., & Lack, A. (1996). *The natural history of pollination*: HarperCollins Publishers.

Puterbaugh, M. N. (1998). The roles of ants as flower visitors: experimental analysis in three alpine plant species. *Oikos*, 36-46.

Ramsey, M. (1995). Ant pollination of the perennial herb *Blandfordia grandiflora* (Liliaceae). *Oikos*, 265-272.

Rapini, A. (2002). Six new species of *Ditassa* R. Br. from the Espinhaço Range, Brazil, with notes on generic delimitation in Metastelmatinae (Apocynaceae-Asclepiadoideae). *Kew Bulletin*, 565-583.

Rapini, A. (2012). Taxonomy" under construction": advances in the systematics of Apocynaceae, with emphasis on the Brazilian Asclepiadoideae. *Rodriguésia*, 63(1), 075-088.

RICO-GRAY, V. (1989). The importance of floral and circum-floral nectar to ants inhabiting dry tropical lowlands. *Biological Journal of the Linnean Society*, 38(2), 173-181.

Shuttleworth, A., & Johnson, S. D. (2012). The Hemipepsis wasp-pollination system in South Africa: a comparative analysis of trait convergence in a highly specialized plant guild. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 168(3), 278-299.

Silva, N. M. F., da Conceição Valente, M., Pereira, J. F., Filho, G. M. A., & Andrade, L. R. (2008). Morfoanatomia de espécies brasileiras de *Oxypetalum* (Asclepiadoideae—Apocynaceae). *Rodriguésia*, 915-948.

Torres-Contreras, H., & Vasquez, R. (2004). A field experiment on the influence of load transportation and patch distance on the locomotion velocity of *Dorymyrmex goetschi* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux*, 51(3), 265-270.

Torres-Contreras, H., & Vasquez, R. A. (2007). Spatial heterogeneity and nestmate encounters affect locomotion and foraging success in the ant *Dorymyrmex goetschi*. *Ethology*, 113(1), 76-86.

Tucker, S. C. (1997). Floral evolution, development, and convergence: the hierarchical-significance hypothesis. *International journal of plant sciences*, S143-S161.

Vasconcelos, H. L., Vilhena, J., Magnusson, W. E., & Albernaz, A. L. (2006). Long-term effects of forest fragmentation on Amazonian ant communities. *Journal of Biogeography*, 33(8), 1348-1356.

Vega, C., Arista, M., Ortiz, P. L., Herrera, C. M., & Talavera, S. (2009). The ant-pollination system of *Cytinus hypocistis* (Cytinaceae), a Mediterranean root holoparasite. *Annals of botany*, 103(7), 1065-1075.

Vega, C., & Herrera, C. M. (2013). Microorganisms transported by ants induce changes in floral nectar composition of an ant-pollinated plant. *American Journal of Botany*, 100(4), 792-800.

Wagner, D. (2000). Pollen viability reduction as a potential cost of ant association for *Acacia constricta* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 87(5), 711-715.

Wiemer, A., Sérsic, A., Marino, S., Simões, A., & Cocucci, A. (2011). Functional morphology and wasp pollination of two South American asclepiads (Asclepiadoideae–Apocynaceae). *Annals of botany*, mcr268.

Wolff, D., Meve, U., & Liede-Schumann, S. (2008). Pollination ecology of Ecuadorian Asclepiadoideae (Apocynaceae): How generalized are morphologically specialized flowers? *Basic and Applied Ecology*, 9(1), 24-34.

Wyatt, R. (1981). Ant-pollination of the granite outcrop endemic *Diamorpha smallii* (Crassulaceae). *American Journal of Botany*, 1212-1217.

Yanoviak, S. P., Dudley, R., & Kaspari, M. (2005). Directed aerial descent in canopy ants. *Nature*, 433(7026), 624-626.

TABELAS

Tabela 1 – Registros de formigas removendo polinários de Asclepiadoideae (Apocynaceae)

Espécies		Local	
Planta	Formiga		
<i>Asclepias curassavica</i>	<i>Monomorium</i> sp.	Índia	(Chaturvedi & Pant 1986)
<i>A. exaltata</i>	<i>Lasius niger</i>	Estados Unidos	(Betz et al. 1994)
<i>A. syriaca</i>	<i>Formica subsericea</i>	Estados Unidos	(Kephart 1979)
<i>Gomphocarpus fruticosus</i>	<i>Camponotus</i> sp.	África do Sul	(Meve não publicado)
	<i>Formicidae</i> sp	África do Sul	(Coombs et al. 2009)
<i>G. physocarpus</i>	<i>Iridomyrmex</i>		
	<i>purpureus</i>	Austrália	(Forster 1994)
	<i>Polyrachis</i> spp		
<i>Leptadenia pyrotechnica</i>	<i>Crematogaster</i> sp.	Paquistão	(Ali 1994)
<i>L. reticulata</i>	<i>Crematogaster</i> sp.	Índia	(Pant et al.1982)
presentes no banco de dados Asclepol até 02/2015 (Ollerton e Liede 1997)			

Tabela 2 – Comparação entre os atributos* de plantas polinizadas por formigas existentes na literatura e os das espécies *Ditassa rothundifolia* e *D. capillaris* em área de Caatinga no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco – Brasil.

Polinização por formigas		<i>D. rothundifolia</i>	<i>D. capillaris</i>
Atributos gerais			
Local	Locais áridos, ou em altas altitudes	(≈) Floresta seca com pouca chuva e temperaturas altas	
Hábito	Herbáceo, prostrado no solo ou espalhando-se sobre rochas, formam adensados de diferentes indivíduos	(≈) Subarbusto rupícola	(≠) Trepadeira de dossel
Tamanho	Pequeno com flores próximas ao solo	(≈) Atinge pouco mais de 0,5m de altura e 0,7m de diâmetro	(≠) Tem camadas espalhadas por até mais de 2m ²
Atributos florais e reprodutivos			
Simetria floral	Preferencialmente Actinomorfa	(=) Actinomorfa	
Tamanho	Pequeno	(=) Tamanho pequeno, diâmetro de poucos milímetros	
Cor	Cores claras e inespícuas	(=) Clara levemente esverdeada	
Tipo floral	Disco ou taça	(=) Disco	
Forma de inserção	Séssil ou de pedúnculos curtos	(=) Pedúnculos curtos com flores pêndulas.	
Quantidade de néctar	Pouco	(=) Pouco	
Acesso ao néctar	Aberto e facilitado	(≈) Dificuldade de acesso	(=) De fácil acesso, com

		intermediária, com néctar totalmente néctar parcialmente exposto sob elementos de corona
Pólen	Pouca quantidade, desestimulando a limpeza	($\approx$) Reunido em poucas unidades (5 polínarios com duas polínias cada)
Óvulos	Uniovulado ou poucos óvulos, demandando poucos óvulos para a polinização	($\neq$) Quantidade de óvulos intermediária, cerca de 30 e 15 óvulos por flor respectivamente.
Quantidade de flores	Poucas flores por indivíduo evitando geitonogamia	($\neq$) Muitas flores, chegando até centenas abertas em um mesmo indivíduo
Sincronia de floração	Pouca em um mesmo indivíduo, mas forte na população	($\approx$) Indivíduos floram sempre no mesmo período

*Lista de atributos elaborada a partir de Hickman (1974), Faegri & Pijl (1979) Peakall et al (1991) e Beattie (2006) (= Semelhante ao padrão; $\approx$ próximo ao padrão; $\neq$ diferente do padrão).

Tabela 3 – Quantificação de visitas das formigas às flores de duas espécies de *Ditassa* (Asclepiadoideae) em área de Caatinga no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco – Brasil.

	<i>D. thoracicus</i> sobre <i>D. rothundifolia</i> (n=35)	<i>Cephalotes sp.</i> sobre <i>D. capillaris</i> (n=20)	Valor de p*
Número de visitas/hora	<u>11±4</u>	9±2	0,036
Duração da visita	40±22 s	<u>57±16 s</u>	0,001
Tempo de visitas/hora	26:54±9:54 min	<u>33:12±7:30 min</u>	0,030

*diferenças significativas com $\alpha < 0,05$

Tabela 4 – Número de polínias de espécies de *Ditassa* (Asclepiadoideae) encontradas nos diferentes locais do corpo de formigas polinizadoras em área de Caatinga no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco – Brasil.

Polínias de:	Sobre as formigas	Local do corpo			
		Antena	Aparato bucal	Parte ventral	Perna
<i>D. capillaris</i>	<i>Cephalotes sp.</i> (n=50)	0	11	8	6
<i>D. rothundifolia</i>	<i>Dorymyrmex thoracicus</i> (n=135)	2	0	0	5

FIGURAS

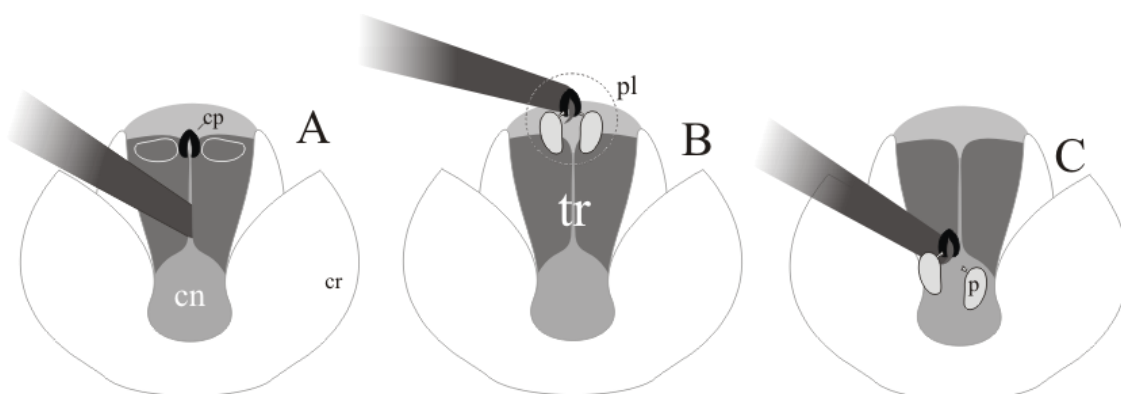


Figura 1 – Sequência de remoção e deposição de polínia a partir de esquema ilustrando uma das cinco subunidades de polinização da flor de *Ditassa capillaris*: inicialmente uma parte do animal (língua, palpo, perna) é inserido no trilho (A), ao deslocá-lo para cima, ocorre a remoção do corpúsculo que arrasta as polínias (B), em uma nova visita a polínia se desprende do corpúsculo ficando retida no trilho (C). (cn – câmara nectarífera; cr – coroa; cp - corpúsculo; tr – trilho; pl – polinário; p – polínia)

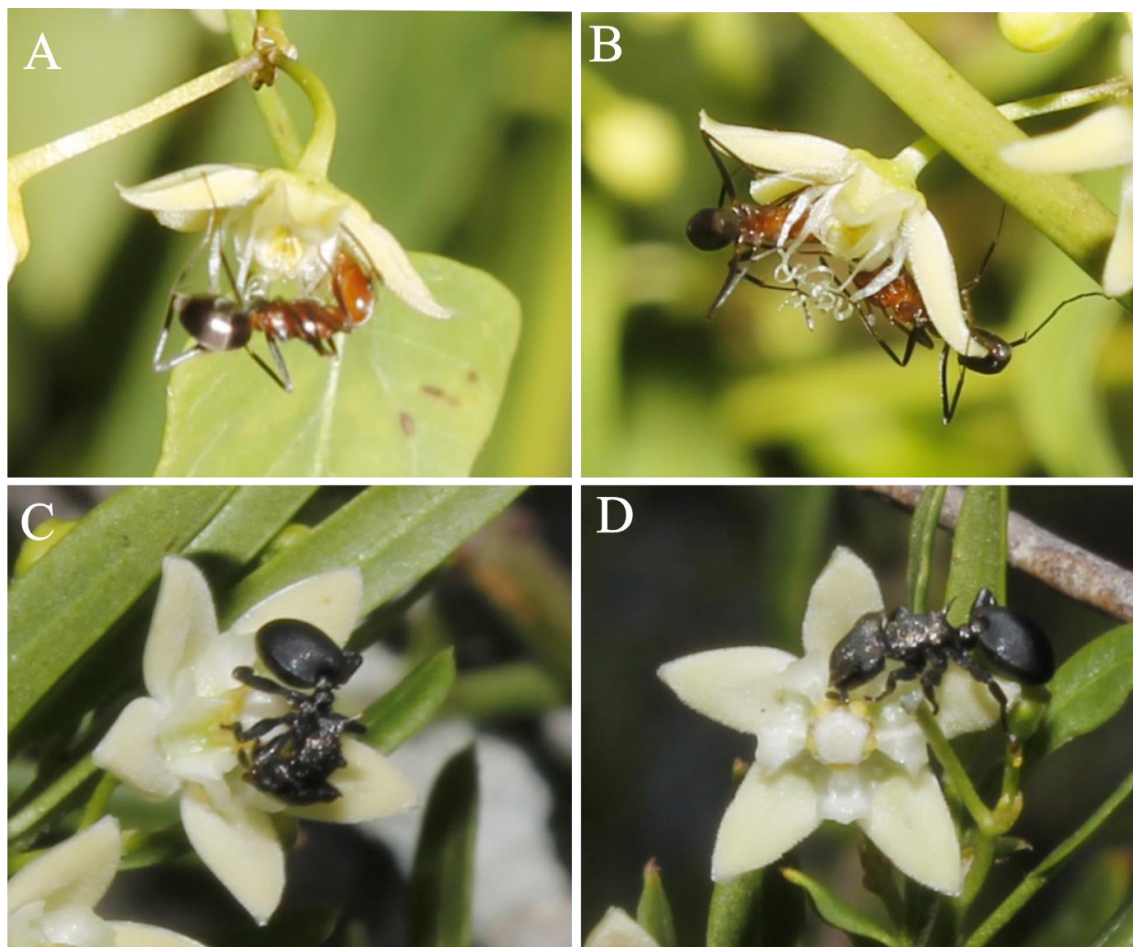


Figura 2 – Comportamento de visita das formigas nas flores de suas respectivas plantas em área de Caatinga no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco – Brasil. *Dorymyrmex thoracicus* visitando flores de *Ditassa rothundifolia* assumindo distintas posições: apoiando-se sobre os apêndices da coroa com pernas sobre ginostégio e pétalas (A) e apoiando-se sobre pétalas acessando a câmara nectarífera pela frente (B). *Cephalotes* sp. visitando flores de *D. capillaris* também em distintas posições: apoiando-se sobre a cabeça do estigma com pernas sobre ginostégio e pétalas (C) e apoiando-se sobre pétalas acessando a câmara nectarífera pela lateral da flor (D).

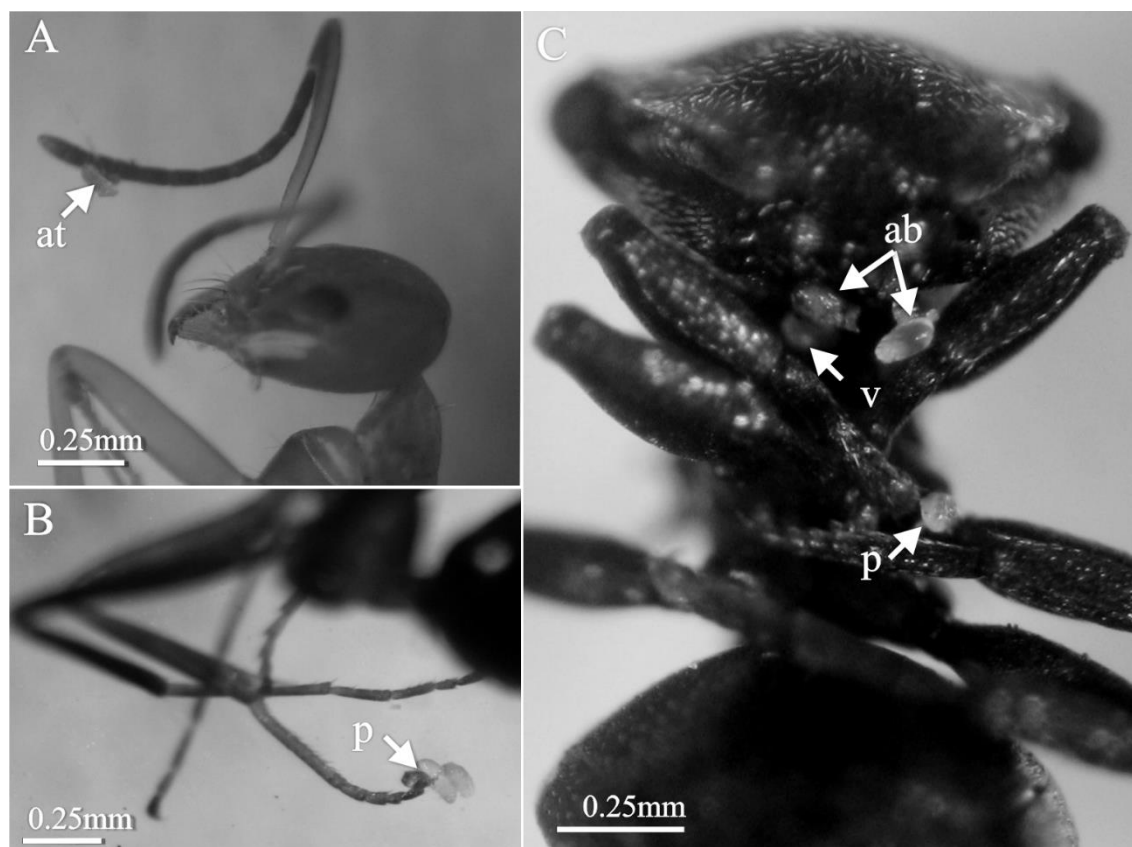


Figura 3 – Polínias (setas) de *Ditassa rothundifolia* (Asclepiadoideae) sobre antena (at) e perna (p) da formiga *Dorymyrmex thoracicus* (A e B) e polínias (setas) de *Ditassa capillaris* aderidas ao aparato bucal (ab), porção ventral (v) e perna (p) da formiga *Cephalotes* sp (C). Ambos os casos em área de Caatinga no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco – Brasil.

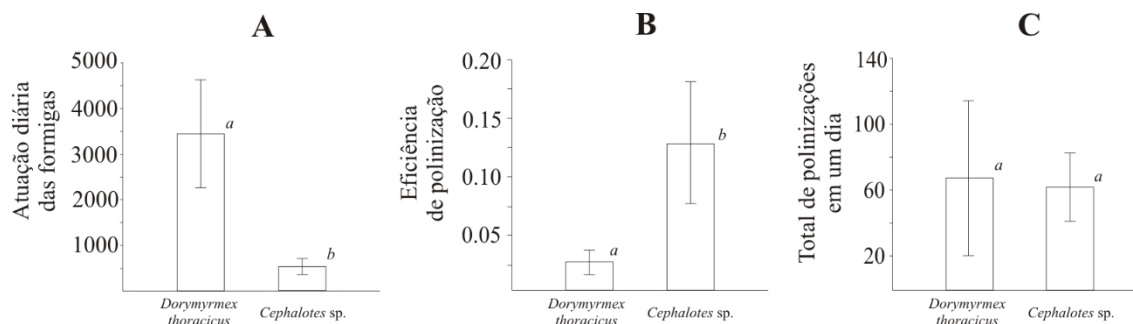


Figura 4 – Interação *Dorymyrmex thoracicus*-*Ditassa rothundifolia* e *Cephalotes sp.*-*D. capillaris* quanto a atuação, efetividade e estimativa de flores polinizadas. Os valores foram obtidos ponderando-se valores de número de formigas por ramo, período de atuação, número de polínias transportadas e taxa de deposição, onde (A) atuação diária representa a quantidade de formigas/m³ de ramo, ponderada pelas horas de atividade/dia; (B) eficiência de polinização representa a média de polínias transportadas/formiga ponderada pela razão deposição/remoção de polínias; (C) o total de polinizações é uma estimativa do valor total de polínias depositadas em por m³ de ramo em um dia de atividade das formigas, resultado da ponderação entre atuação e efetividade. (Letras distintas indicam diferença significativa com $\alpha \leq 0,05$)

6 CONCLUSÕES

As três abordagens por nós realizadas nesta dissertação nos permitiram tirar uma série de conclusões importantes sobre como as flores complexas de *Asclepiadoideae* se relacionam com diferentes polinizadores. Desta forma, trouxemos novas perspectivas na busca do entendimento desta confusa relação da Subfamília com a especialização e generalização.

A primeira conclusão importante diz respeito à importância da antera em saia. Reunimos indícios suficientes para demonstrar a demanda da flor por uma especialização funcional que está atrelada principalmente a morfologia e atuação da antera em saia. Sobre as peculiaridades desta estrutura realizamos os seguintes avanços: localizamos e justificamos a necessidade de nectários secundários em sua base possibilitando maior precisão no horário e local de oferta do recurso; esclarecemos que os mesmos têm uma atuação semelhante a nectários substitutivos; e mostramos que a antera em saia pode funcionar como um funil que guia o corpo do polinizador.

A segunda conclusão refere-se a como a micromorfometria pode explicar níveis de especialização fenotípica com repercussão ecológica. Ao utilizarmos medições da capacidade dos locais onde o néctar é acumulado mostramos que mesmo quantidades ínfimas de néctar podem influenciar a atração dos polinizadores. Todavia, nossa principal descoberta diz respeito à interação com a superfície das pétalas em relação ao tamanho dos polinizadores efetivos. Nós corroboramos nossas expectativas sobre uma maior complexidade na epiderme das flores cujo os principais polinizadores as utilizam como plataforma de pouso. Isso exemplifica como um substrato vivo pode sofrer seleção ante os animais que locomovem-se sobre ele, situação que geralmente ocorre ao contrário (animais adequam-se ao substrato).

Por fim, nossa última conclusão é sobre a importância das formigas na polinização de *Asclepiadoideae*. Legitimamos a eficiência destes insetos como polinizadores e compreendemos que suas histórias naturais afetam essa interação, sobretudo no que diz respeito a atuação e eficiência. Mostramos que as flores propiciam o sistema através de sua morfologia, mecanismo de polinização envolvendo polínias e a resistência a glândula metapleural. Acreditamos que este sistema pode ser mais comum do que se conhece atualmente, sobretudo nas *Metastelmatinae* que têm seu centro de endemismo na América do Sul.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTENBURGER, R.; MATILE, P. Circadian rhythmicity of fragrance emission in flowers of *Hoya carnos* R. Br. **Planta**, v. 174, n. 2, p. 248-252, 1988.

AMES, O.; AMES, B. Pollination of orchids through pseudocopulation. **Botanical Museum Leaflets, Harvard University**, p. 1-xix, 1937.

ARDITTI, J. et al. ‘Good Heavens what insect can suck it’—Charles Darwin, *Angraecum sesquipedale* and *Xanthopan morgani praedicta*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 3, p. 403-432, 2012.

ARMBRUSTER, S.; FENSTER, C.; DUDASH, M. Pollination 'principles' revisited: specialization, pollination syndromes, and the evolution of flowers. **The Scandinavian Association for Pollination Ecology Honours Knut Faegri**, v. 39, p. 179-200, 2000.

ARMBRUSTER, W. S.; BALDWIN, B. G. Switch from specialized to generalized pollination. **Nature**, v. 394, n. 6694, p. 632-632, 1998.

BLASER, H. W. Studies in the morphology of the Cyperaceae. I. Morphology of flowers. A. Scirpoid genera. **American Journal of Botany**, p. 542-551, 1941.

BOOKMAN, S. S. The floral morphology of *Asclepias speciosa* (Asclepiadaceae) in relation to pollination and a clarification in terminology for the genus. **American Journal of Botany**, p. 675-679, 1981.

COCUCCI, A. A. et al. The buck in the milkweed: evidence of male–male interference among pollinaria on pollinators. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 280-286, 2014.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge University Press, 1993. ISBN 0521450586.

ENDRESS, M. E.; BRUYNS, P. V. A revised classification of the Apocynaceae sl. **The Botanical Review**, v. 66, n. 1, p. 1-56, 2000.

ENDRESS, P. K. Patterns of floral construction in ontogeny and phylogeny. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 39, n. 2, p. 153-175, 1990.

ENDRESS, P. K.; STEINER-GAFNER, B. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge University Press, 1996. ISBN 0521565103.

FAEGRI, K.; PIJL, L. V. D. **The principles of pollination ecology**: Oxford etc.: Pergamon Press xi, 244p.-Illus.. Reproductive Biology (KR, 197909240) 1979.

FENSTER, C. B.; MARTÉN-RODRÍGUEZ, S. Reproductive assurance and the evolution of pollination specialization. **International Journal of Plant Sciences**, v. 168, n. 2, p. 215-228, 2007.

FISHBEIN, M. Evolutionary innovation and diversification in the flowers of Asclepiadaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 603-623, 2001.

FRAME, D. Generalist flowers, biodiversity and florivory: implications for angiosperm origins. **Taxon**, v. 52, n. 4, p. 681-685, 2003.

GALIL, J.; ZERONI, M. Nectar system of *Asclepias curassavica*. **Botanical Gazette**, p. 144-148, 1965.

KEVAN, P.; EISIKOWITCH, D.; RATHWELL, B. The Role of Nectar in the Germination of Pollen in *Asclepias syriaca* L. **Botanical Gazette**, p. 266-270, 1989.

KUNZE, H. Corona and nectar system in Asclepiadinae (Asclepiadaceae). **Flora: Morphologie, Geobotanik, Oekophysiologie**, 1997.

KUNZE, H.; WANNTORP, L. The gynostegium of *Hoya spartioides* (Apocynaceae–Asclepiadoideae): A striking case of incongruence between molecular and phenotypic evolution. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 8, n. 5, p. 346-357, 2008.

LIEDE, S.; KUNZE, H. A descriptive system for corona analysis in Asclepiadaceae and Periplocaceae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 185, n. 3-4, p. 275-284, 1993.

LIEDE, S.; WHITEHEAD, V. Studies in the pollination biology of *Sarcostemma viminale* R. Br. sensu lato. **South African journal of botany: official journal of the South African Association of Botanists= Suid-Afrikaanse tydskrif vir plantkunde: amptelike tydskrif van die Suid-Afrikaanse Genootskap van Plantkundiges**, 1991.

MEVE, U.; LIEDE-SCHUMANN, S. CEROPEGIA (APOCYNACEAE, CEROPEGIEAE, STAPELIINAE): PARAPHYLETIC BUT STILL TAXONOMICALLY SOUND 1. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 94, n. 2, p. 392-406, 2007.

MONDRAGÓN-PALOMINO, M.; THEIßEN, G. MADS about the evolution of orchid flowers. **Trends in plant science**, v. 13, n. 2, p. 51-59, 2008.

MORILLO, G. El género *Marsdenia* en Venezuela, Colombia y Ecuador. **Acta Botánica Venezuélica**, p. 23-74, 1978.

OLLERTON, J. et al. Multiple meanings and modes: on the many ways to be a generalist flower. **Taxon**, p. 717-728, 2007.

OLLERTON, J.; LIEDE, S. Pollination systems in the Asclepiadaceae: a survey and preliminary analysis. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 62, n. 4, p. 593-610, 1997.

_____. Corona structure in *Cynanchum*: linking morphology to function. **Ecotropica**, v. 9, p. 107-112, 2003.

OLLERTON, J. et al. Fly pollination in *Ceropegia* (Apocynaceae: Asclepiadoideae): biogeographic and phylogenetic perspectives. **Annals of botany**, p. mcp072, 2009.

OMLOR, R. Generische Revision der Marsdenieae (Asclepiadaceae). **Aachen: Shaker Verlag ix, 257p.-illus.. ISBN 3826540220 Ge (En) Icones, Anatomy and morphology, Keys. Thesis, 1998.**

PAUW, A. Pollen transfer on birds' tongues. **Nature**, v. 394, n. 6695, p. 731-732, 1998.

POTT, M. B.; PICHERSKY, E.; PIECHULLA, B. Evening specific oscillations of scent emission, SAMT enzyme activity, and SAMT mRNA in flowers of *Stephanotis floribunda*. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, n. 8, p. 925-934, 2002.

PROCTOR, M.; YEO, P.; LACK, A. **The natural history of pollination.** HarperCollins Publishers, 1996. ISBN 000219905X.

RAPINI, A. Six new species of *Ditassa* R. Br. from the Espinhaço Range, Brazil, with notes on generic delimitation in Metastelmatinae (Apocynaceae-Asclepiadoideae). **Kew Bulletin**, p. 565-583, 2002.

_____. "Taxonomy" under construction": advances in the systematics of Apocynaceae, with emphasis on the Brazilian Asclepiadoideae. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 075-088, 2012.

RAPINI, A.; VAN DEN BERG, C.; LIEDE-SCHUMANN, S. DIVERSIFICATION OF ASCLEPIADOIDEAE (APOCYNACEAE) IN THE NEW WORLD 1. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 94, n. 2, p. 407-422, 2007.

RUDALL, P. J. et al. Evolution of reproductive structures in grasses (Poaceae) inferred by sister-group comparison with their putative closest living relatives, Ecdeiocoleaceae. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 9, p. 1432-1443, 2005.

SHUTTLEWORTH, A.; JOHNSON, S. D. Palp-faction: an African milkweed dismembers its wasp pollinators. **Environmental entomology**, v. 38, n. 3, p. 741-747, 2009.

VERHOEVEN, R. L.; VENTER, H. J. T. Pollen morphology of the Periplocoideae, Secamonoideae, and Asclepiadoideae (Apocynaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 569-582, 2001.

VIEIRA, M.; SHEPHERD, G. Pollinators of Oxypetalum (Asclepiadaceae) in southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 4, p. 693-704, 1999.

VIEIRA, M. F.; FONSECA, R. S.; SHEPHERD, G. J. Morfologia floral e mecanismos de polinização em espécies de Oxypetalum R. Br.(Apocynaceae, Asclepiadoideae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 3, p. 314, 2012.

VOGEL, S. Floral syndromes: empiricism versus typology. **Botanische Jahrbücher**, v. 127, n. 1, p. 5-11, 2006.

WANNTORP, L. et al. Towards a monophyletic Hoya (Marsdenieae, Apocynaceae): Inferences from the chloroplast trnL region and the rbcL-atpB spacer. **Systematic botany**, v. 31, n. 3, p. 586-596, 2006.

WIEMER, A. et al. Functional morphology and wasp pollination of two South American asclepiads (Asclepiadoideae–Apocynaceae). **Annals of botany**, p. mcr268, 2011.

WOLFF, D.; MEVE, U.; LIEDE-SCHUMANN, S. Pollination ecology of Ecuadorian Asclepiadoideae (Apocynaceae): How generalized are morphologically specialized flowers? **Basic and Applied Ecology**, v. 9, n. 1, p. 24-34, 2008.

WYATT, R.; BROYLES, S. B.; LIPOW, S. R. Pollen-ovule ratios in milkweeds (Asclepiadaceae): an exception that probes the rule. **Systematic Botany**, v. 25, n. 2, p. 171-180, 2000.

YAMASHIRO, T.; MAKI, M. A comparative study of the reproductive character and genetic diversity of an autogamous Tylophora matsumurae and its progenitor Tylophora tanakae (Apocynaceae-Asclepiadoideae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 1-4, p. 55-67, 2005.

ANEXO A. NORMAS DE SUBMISSÃO PARA O AMERICAN JOURNAL OF BOTANY

SCOPE AND AIMS OF THE JOURNAL

The American Journal of Botany (AJB) publishes peer-reviewed, innovative, significant research of interest to a wide audience of plant scientists in all areas of plant biology, all levels of organization, and all plant groups and allied organisms. AJB requires authors to frame their research questions and discuss their results in terms of major questions of plant biology. In general, papers that are too narrowly focused, purely descriptive, natural history, broad surveys, or that contain only preliminary data will not be considered.

Review Procedure and Policy

All manuscripts are evaluated by members of the Editorial board to determine whether the paper should go forward for peer review. Papers sent out for review will, typically, be sent to two or three independent referees. Authors may suggest possible referees, or indicate referees to be excluded. In both cases, justification should be provided. Papers are evaluated for innovations in, significant contributions to, and noteworthy advances in the theoretical or conceptual bases of the subdisciplines of plant biology, and/or novel insights of general relevance to fundamental questions of biology (see http://www.botany.org/ajb/AJB_Reviewer_Instructions.pdf for review criteria). Phylogenetic analyses will generally only be considered if the phylogeny is used to test explicit evolutionary and/or ecological hypotheses or morphological associations—essentially a significant discussion of the impact and/or use of the phylogeny.

Final acceptance of a manuscript is contingent upon compliance with Journal requirements as outlined below. Articles that have undergone complete peer review and copyediting, as well as full review by the authors, will be posted online as soon as possible.

As normas completas para publicação podem ser acessadas em:

<<http://www.amjbot.org/site/misc/ifora.xhtml>>

ANEXO B. NORMAS DE SUBMISSÃO PARA A PLOS ONE

Style and Format

File format

Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, RTF, or PDF. Microsoft Word documents should not be locked or protected.

LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. Read the LaTeX guidelines.

Length

Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information.

We encourage you to present and discuss your findings concisely.

Font

Use a standard font size and any standard font, except for the font named “Symbol”. To add symbols to the manuscript, use the Insert → Symbol function in your word processor or paste in the appropriate Unicode character.

Headings

Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.

Layout and spacing

Manuscript text should be double-spaced.

Do not format text in multiple columns.

As normas completas para publicação podem ser acessadas em:

<<http://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>>

ANEXO C. NORMAS DE SUBMISSÃO PARA O PERIÓDICO ANIMAL BEHAVIOUR

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

Types of article

Research papers

Animal Behaviour publishes original papers relating to all aspects of the behaviour of animals, including humans. Papers may be field, laboratory or theoretical studies. Preference is given to studies that are likely to be of interest to the broad readership of the Journal and that test explicit hypotheses rather than being purely descriptive.

Reviews

These should address fundamental issues relating to behaviour and provide new insights into the subject(s) they cover. Original interdisciplinary syntheses are especially welcome.

Reviews should be no longer than 6000 words (excluding references) and should include an abstract of up to 300 words. In the first instance, a preliminary outline of up to 600 words should be submitted online (see Contact details for submission below). The decision as to whether to proceed to a full review then rests with the Executive Editors or invited advisers. Contributions submitted on this basis will be subjected to the same refereeing process as normal manuscripts.

As normas completas para publicação podem ser acessadas em:

<<https://www.elsevier.com/journals/animal-behaviour/0003-3472/guide-for-authors>>