

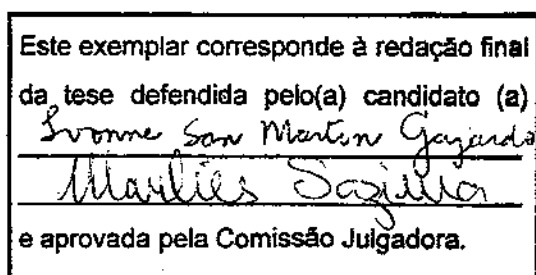
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



**BIOLOGIA DA POLINIZAÇÃO DE ESPÉCIES DA TRIBO
SINNINGIEAE (GESNERIACEAE) NO SUDESTE DO
BRASIL**

Ivonne San Martin-Gajardo

Orientadora: Profa. Dra. Marlies Sazima



Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do título
de Doutor em Biologia Vegetal

Campinas - 2004

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNIDADE BC
Nº CHAMADA TUNICAMP
Sa53b
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 58463
PROC 16 - 117 - 04
C _____ D A
PREÇO R\$ 11,00
DATA 22-06-04
Nº CPD _____

CM00198322-7

BIB ID 317715

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Sa53b

San Martin - Gajardo, Ivonne Claudia

Biologia da polização de espécies da tribo Sinningieae (Gesneriaceae) no
sudeste do Brasil / Ivonne Claudia San Martin Gajardo.--
Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientadora: Marlies Sazima

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1. Beija-flor. 2. Abelha. 3. Morcego--Ecologia. 4. Evolução (Biologia).
I. Sazima, Marlies. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Data 18/02/2004

1. Profª. Dra. Marlies Sazima (Orientadora)
2. Prof. Dr. Alain Chautems
3. Prof. Dr. João Semir
4. Profª. Dra. Silvana Buzato
5. Prof. Dr. Volker Bittrich
6. Profª. Dra. Eliana F. Martins
7. Profª. Dra. Roseli Buzanelli Torres

Marlies Sazima
Alain Chautems

Silvana Buzato

V. Bittrich

Eliana F. Martins

AGRADECIMENTOS

À Marlies Sazima pela oportunidade, confiança, incentivo e orientação e principalmente pelo carinho com que tratou da minha formação humana, acadêmica e profissional;

Ao Dr. Alain Chautems pelo interesse, sugestões e discussões nas diversas etapas deste projeto e pela sua generosa hospitalidade em Genebra;

Aos professores João Semir, Alain Chautems e Silvana Buzato pela leitura dos manuscritos, sugestões e discussões durante a fase de pré-banca;

Ao professor Volker Bittrich pelas sugestões e disponibilidade em participar da banca examinadora;

Ao Dr. Mathieu Perret pelas sugestões sobre as análises estatísticas apresentadas no trabalho e extensas discussões;

Ao Dr. Michael Moller discussões e facilidades oferecidas durante minha estadia em Edimburgo;

Aos pesquisadores Peter Gibbs e Isabel Alves dos Santos pela leitura crítica dos manuscritos da tese;

Aos pesquisadores I. Alves dos Santos, M. C. Gaglianone and A. J. C Aguiar pela identificação das espécies de abelhas;

Aos colegas e amigos Eduardo Gross, Giovana, Kayna, Silvia Well, Charley Brown, Julio e Maia, Fernandão, Rodrigo Bustos, Sr. Vitor, Emerson Pansarin, Carla e Rogério Lupo, Luciana Gomes, Rafaela Forzza e Fernandinha Aquino pelo auxílio e companhia no trabalho de campo;

Ao colega Lúcio Leoni pela hospitalidade e ajuda no campo em Carangola;

Ao colega e amigo Leonardo Meireles pelas discussões das análises estatísticas;

Aos pesquisadores Sergio Cardoso e Tânia Wendt por disponibilizar o uso do equipamento de informática;

À Yara Bressan pelo auxílio no trabalho de laboratório e sua disponibilidade sempre que necessária;

Aos diretores do IBAMA/MMA, Instituto Florestal/MG, Instituto Botânico/SP, Museu de Biologia Mello Leitão, Reserva Santa Lúcia, Escola Agrotécnica de São João de Petrópolis e Reserva Particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça pelas autorizações de pesquisa nas áreas sob a sua guarda;

À CAPES, FAPESP e ao Cnpq pelos recursos financeiros concedidos;

À Sub-Comissão de Biologia Vegetal do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, UNICAMP, através de Ana Tozzi, ao Depto. de Botânica, UNICAMP, pela oportunidade oferecida para a realização de meus estudos e o desenvolvimento do projeto de tese;

Aos professores, funcionários e colegas do Depto. de Botânica, UNICAMP, pelo companheirismo, pelo auxílio em várias etapas do projeto de tese e pelo compartilhamento de conhecimentos e discussões fundamentais para minha formação;

Aos fiéis amigos Cibele Castro, Roberta Macedo, Simone de Padua, Fenanda Aquino, Leonardo Meireles, Márcia Rocca, Christiano Verola, Bete Canela e Luciana Gomes pela hospitalidade nos períodos de transição.

Ao meu pai pelo esforço em propiciar as condições para que eu desenvolvesse meus estudos;

Ao Leandro Freitas pela colaboração, atenção e incentivo constantes em todas as etapas deste projeto.

SUMÁRIO

Resumo.....	01
Abstract.....	02
Introdução Geral.....	03
Capítulo I – Non-euglossine bees also function as pollinators of <i>Sinningia</i> species (Gesneriaceae) in southeastern Brazil.....	10
Capítulo II - Biologia floral e polinização por beija-flores em espécies de <i>Vanhouttea</i> e <i>Sinningia</i> (Gesneriaceae) no sudeste do Brasil.....	24
Capítulo III - Chiropterophily in <i>Sinningieae</i> : Two bat-pollinated species and one intermediate case pollinated by hummingbirds.....	41
Capítulo IV - Caracteres Florais Associados aos Polinizadores em Espécies da Tribo <i>Sinningieae</i> : uma Análise Comparativa.....	56
Considerações Finais.....	77.

RESUMO – A tribo Sinningieae (Gesneriaceae) apresenta três gêneros, *Sinningia*, *Paliavana* e *Vanhouttea* que reúnem aproximadamente 85 espécies, as quais abrangem diversas síndromes de polinização inferidas a partir da morfologia floral. Em 18 espécies de *Sinningia*, três de *Vanhouttea* e três de *Paliavana* foram estudados aspectos relacionados à fenologia de floração, à morfologia e biologia floral e aos agentes polinizadores. Este estudo apresenta três capítulos que abrangem os principais sistemas de polinização e um último, no qual os dados sobre a biologia da polinização foram analisados em um contexto filogenético da tribo, com o objetivo de elucidar os processos evolutivos destes sistemas. No primeiro capítulo, foram estudadas quatro espécies de *Sinningia* que apresentam flores com diferentes formas, tamanhos, cores e características do néctar e que são polinizadas por abelhas de grupos diferentes. Este resultado corrobora com a idéia de que sistemas de polinização envolvendo abelhas se originaram diversas vezes em Sinningieae. No segundo capítulo são apresentados resultados sobre três espécies *Vanhouttea* e três de *Sinningia* polinizadas por beija-flores. As flores destas espécies são tubulares, avermelhadas e inodoras. Os nectários diferem entre *Vanhouttea* e *Sinningia*, o que pode estar relacionado com diferenças na produção de néctar. A polinização por Trochilinae ou Phaethornithinae parece ser determinada pelo hábitat de cada espécie de planta, enquanto que a frequência de visitas dos beija-flores a cada espécie aparentemente é determinada pelas características do néctar. O terceiro capítulo trata de três espécies apontadas como quiropterófilas. De fato, *Sinningia brasiliensis* e *Paliavana prasinata* apresentam flores infundibuliformes, verdes, com néctar abundante durante a noite e odor forte e são efetivamente polinizadas por morcegos. Entretanto, *P. sericiflora* apresenta características florais intermediárias entre ornitofilia e quiropterofilia, porém é polinizada exclusivamente por beija-flores. Ausência de odor forte parece determinar a não atratibilidade de morcegos às flores de *P. sericiflora*. Por último, caracteres florais e os principais grupos polinizadores de 23 espécies da tribo são analisados em um contexto filogenético. A forma floral e o tamanho das estruturas reprodutivas foram significativamente associados à mudança do tipo de polinizador. O mapeamento dos polinizadores sobre a árvore filogenética indicou evolução paralela dos sistemas de polinização nos diferentes clado da tribo Sinningieae.

Palavras-chave: biologia da polinização, beija-flores, abelhas, morcegos, análises filogenéticas comparativas.

ABSTRACT – The pollination biology of species from the tribe Sinningieae (Gesneriaceae) was studied in southeastern Brazil. This tribe is composed by three genera (*Sinningia*, *Paliavana* and *Vanhouttea*) and about 85 species, which display diverse pollination syndromes. Flowering phenology, flower morphology, floral biology and pollination agents were studied in 18 species of *Sinningia*, three of *Vanhouttea* and three of *Paliavana*. The first three chapters concern the main pollination systems in the tribe, and in the fourth chapter, data on pollination biology are analyzed on a phylogenetic context for understanding the shifts in pollination systems within the tribe. The first chapter describes the pollination by bees, belonging to different groups, of four *Sinningia* species, which bear flowers with different shape, dimensions, colors and nectar features. Such results corroborate the idea that bee pollination arose several times in Sinningieae. Three species of *Vanhouttea* and three of *Sinningia* bearing tubular, reddish and scentless flowers and pollinated by hummingbirds are studied in the second chapter. Floral nectaries diverge between *Vanhouttea* and *Sinningia*, and such a trait seems to be related to differences in nectar production between species of both genera. Pollination by either Trochilinae or Phaethornithinae seems to be linked to the habitat of each species, and the frequency of floral visits seems to be related to nectar features. The next chapter deals with the chiropterophilous species. Both *Sinningia brasiliensis* and *Paliavana prasinata* bear funnel-shaped, greenish, nocturnal flowers with abundant nectar and strong odour, and are pollinated by bats. However, *P. sericiflora* displays intermediate floral traits between ornithophily and chiropterophily, and are exclusively pollinated by hummingbirds. The non-attraction of bats to the flowers could be caused by the absence of any strong odour in this species. At last, a comparative phylogenetic analysis is carried out covering the flower traits and the main pollinator groups of 23 species of the tribe. Floral shape and the size of reproductive structures are significantly linked to shifts in pollinator groups. The parallel evolution of the pollination systems in the different clades of Sinningieae is evidenced through mapping pollinators on the phylogenetic tree of the tribe.

Key-words: pollination biology, hummingbirds, bees, bats, comparative phylogenetic analysis.

INTRODUÇÃO GERAL

As flores formam a unidade das plantas que permite a ocorrência dos processos sexuais e subsequente produção de sementes. São unidades complexas e diferenciadas em partes as quais possuem estruturas e funções diversas (Endress 1994). As múltiplas funções das partes florais, tais como proteção do néctar e atração de polinizadores pelas pétalas, foram apontadas inicialmente por Sprengel em 1793 (ver Lloyd & Barrett 1996). Porém, foi Darwin em 1862 que propôs pela primeira vez uma abordagem evolutiva para analisar as interações entre caracteres florais e os polinizadores (Pellmyr 2002). Desde então, vasta bibliografia vem sendo produzida sobre as adaptações das flores aos polinizadores (e.g. Vogel 1969, 1990; Stebbins 1970; Campbell 1989, 1996; Grant 1994; Sazima *et al.* 2001), bem como, sobre a evolução de características florais e mudanças de polinizadores dentro de gêneros ou famílias (e.g. Grant & Grant 1965; Armbruster 1992, 1993; McDade 1992; Johnson *et al.* 1998).

A inclusão de uma perspectiva filogenética em análises ecológicas tem o potencial de testar hipóteses sobre a evolução de características florais e sua função em relação aos polinizadores, bem como, determinar o número de transições evolutivas destes caracteres (Weller & Sakai 1999). Por exemplo, McDade (1992) estudou as relações planta-polinizador no complexo *Aphelandra pulcherrima* (Acanthaceae), formados por espécies com flores tubulares e vermelhas, polinizadas por beija-flores Trochilinae e Phaethornithinae. Ao contrário do esperado, a análise filogenética deste complexo indicou que a polinização por Phaethornithinae é ancestral e espécies com corolas de tubo curto evoluíram mais de uma vez. Em espécies de *Dalechampia* (Euphorbiaceae), Armbruster (1992) mapeou diferentes tipos de abelhas polinizadoras sobre a árvore filogenética gerada a partir de dados morfológicos e concluiu que o sistema de polinização de *Dalechampia* é evolutivamente instável. Assim, o sistema de polinização mais comum que envolve abelhas coletoras de resina surgiu uma única vez, entretanto vários tipos diferentes de abelhas coletoras de resina visitam diferentes espécies de *Dalechampia*. Em contraste, o sistema menos comum envolvendo abelhas coletoras de odor evoluiu três ou quatro vezes, acompanhado da variação nas estruturas morfológicas secretoras do recurso. Além destes, um terceiro sistema que envolve abelhas coletoras de pólen evoluiu em duas espécies. A análise filogenética de *Dalechampia* proporcionou uma ferramenta importante para investigar a transição nos sistemas de polinização.

No entanto, limitações no uso da filogenia para compreender processos evolutivos estão relacionadas com a confiabilidade nas hipóteses filogenéticas, que frequentemente são fracamente sustentadas, ou então, não refletem a história evolutiva da linhagem (Weller & Sakai 1999). O desenvolvimento da cladística, combinada ao surgimento da sistemática molecular, amenizou essas limitações, levando a um aumento dos estudos filogenéticos (e.g. Hodges 1997; Barrett & Graham 1997; Hapeman & Inoue 1997; Bruneau 1997; Anderson *et al.* 2002; Hartmann *et al.* 2002; Beardsley *et al.* 2003). Ampla revisão sobre esta abordagem é feita por Weller & Sakai (1999) que apresentam conceitos e métodos do uso de dados morfológicos, moleculares e a combinação de ambos na construção de hipóteses filogenéticas usadas para avaliar sistemas reprodutivos e de polinização.

O aumento da integração entre ecologia e sistemática, somado ao desenvolvimento de uma variedade de métodos comparativos em um contexto filogenético, podem revelar grande quantidade de informações sobre os padrões e processos de evolução das espécies (Diniz-Filho 2000). Este tipo de análise tem sido comumente utilizada para interpretar adaptações de caracteres florais aos grupos de polinizadores (e.g. Armbruster 1996, 2002), bem como, identificar a associação de caracteres morfológicos com o sistema reprodutivo (Barrett *et al.* 1996; Larson & Barrett 2000; Armbruster *et al.* 2002) e determinar a semelhanças atribuídas à ancestralidade comum (Morales 2000; Blomberg & Garland 2002).

A família Gesneriaceae é amplamente distribuída nos trópicos, com cerca de 3000 espécies e 140 gêneros e mais (Burt & Wiehler 1995; Smith *et al.* 1997). A maior parte das Gesneriaceae são conhecidas pelo seu uso e potencial na horticultura, como por exemplo os gêneros *Saintpaulia*, *Streptocarpus*, *Sinningia* e *Chirita*. As espécies desta família apresentam variedade grande de habitat e hábitos, são alogâmicas e tem um ampla gama de formas, tamanhos e coloração nas flores (Wiehler 1983). Esta variação indica síndromes de polinização diferentes, sendo que a maioria é polinizada por beija-flores, numerosas espécies são polinizadas por abelhas, algumas por morcegos e poucas por mariposas (Wiehler 1983).

Nos últimos anos, a taxonomia desta família tem sido estudada extensivamente com base em dados morfológicos (Wiehler 1983; Boggan 1991; Roalson *et al.* 2002), dados moleculares (Moller & Cronk 1997; Smith *et al.* 1997; Smith 2000; Zimmer *et al.* 2002; Roalson *et al.* 2003) e com base na combinação destes dois (Smith 1996; Smith 2000). Três sub-famílias são atualmente reconhecidas em Gesneriaceae: Cyrtandroideae Endl. com distribuição principalmente paleotropical, Coronantheroideae Wiehler que ocorre nas Ilhas do Pacífico Sul, Chile e nordeste da Austrália e Gesnerioideae Dumort com distribuição neotropical (Burt &

Wiehler 1995). A sub-família Gesnerioideae foi inicialmente dividida em cinco tribos: Beslerieae Bartl. & H.L. Wendl., Episcieae Endl., Gesnerieae, Gloxinieae Fritsch e Napeanthaeae Wiehler (Burt & Wiehler 1995). A tribo Sinningieae foi recentemente separada de Gloxinieae por Smith e Atkinson (1998) e agrupa os gêneros *Sinningia* Nees, *Vanhouttea* Lem. e *Paliavana* Vand. A tribo é constituída por aproximadamente 80 espécies e apresenta o centro de diversidade no sudeste brasileiro (Perret *et al.* 2003). Análises cladísticas com base em caracteres morfológicos (Boggan 1991) e estudos de filogenia molecular (Zimmer *et al.* 2002; Perret *et al.* 2003) confirmam a monofilia desta tribo. Entretanto, ainda existem algumas incongruências na formação de clados bem definidos para a tribo Sinningieae. Por exemplo, estes três gêneros são diferenciados freqüentemente, pelo seu hábito e morfologia floral: *Vanhouttea* e *Paliavana* são arbustos, com flores tubulosas e campanuladas, respectivamente, enquanto *Sinningia* é caracterizada pela presença de tubérculo independentemente da morfologia floral. Esta delimitação genérica não é congruente na análise molecular de Perret *et al.* (2003), que indica que *Vanhouttea* e *Paliavana* são gêneros parafiléticos, i.e. surgem inseridos em mais de um clado da tribo.

Em adição, estes três gêneros apresentam uma variedade grande na morfologia floral. Perret *et al.* (2001) inferiram as síndromes de polinização a partir da morfologia para todas as espécies da tribo, classificando 66% das espécies como ornitófilas e 20% melitófilas, além de três espécies quiropterófilas, duas espécies psicófilas e uma espécie esfingófila. No entanto, observações de campo as quais determinem os polinizadores efetivos são restritas a poucas espécies polinizadas por beija-flores (Snow & Teixeira 1982; Sazima *et al.* 1996; Chautems *et al.* 2000; Vasconcelos & Lombardi 2001; Freitas 2002). Assim sendo, a tribo Sinningieae é um grupo propício para estudos de biologia floral e polinização em um contexto filogenético.

No presente estudo são apresentadas informações sobre a biologia da polinização de quatro espécies melitófilas (capítulo I), seis espécies ornitófilas (capítulo II) e três quiropterófilas (capítulo III) da tribo Sinningieae. As relações entre as características florais e os polinizadores principais em um contexto filogenético foram exploradas para 23 espécies da tribo Sinningieae (capítulo IV). O objetivo principal deste último capítulo foi caracterizar os sistemas de polinização destas espécies, cujos dados foram somados à hipótese filogenética com base em dados moleculares da tribo (Perret *et al.* em prep.) para determinar quais caracteres florais estão associados à mudança de polinizador e quais caracteres se originaram independentemente nas diferentes espécies.

REFERÊNCIAS

- Anderson, G.J. *et al.* 2002. Reproductive biology and plant systematics: the growth of a symbiotic association. *Taxon* 51: 637-653.
- Armbruster, W. S. 1992. Phylogeny and the evolution of plant-animal interactions. *BioScience* 42: 12-20.
- Armbruster, W. S. 1993. Evolution of plant pollination systems: hypotheses and tests with the neotropical vine *Dalechampia*. *Evolution* 47: 1480-1505.
- Armbruster, W. S. 1996. Evolution of floral morphology and function: an integrative approach to adaptation, constraint, and compromise in *Dalechampia* (Euphorbiaceae). In: D. G. Lloyd & S.C.H. Barrett (Eds.) *Floral biology: studies on floral Evolution in animal-pollinated plants*. Chapman & Hall, New York. p. 241-272.
- Armbruster, W. S., Mulder C. P. H., Baldwin B. G., Kalisz S., Wessa B. & Nute H. 2002. Comparative analysis of late floral development and mating-system evolution in tribe Collinsieae (Scrophulariaceae s.l.) *Amer. J. Bot.* 89: 37-49.
- Barrett, S. C. H. & Graham, S. W. 1997. Adaptive radiation in the aquatic plant family Pontederiaceae: insights from phylogenetic analysis. In: *Molecular evolution and adaptive radiation*. T.J. Givnish & K.J. Sytsma ed., Cambridge University Press. p. 225-258.
- Barrett, S. C. H., Harder, L. D. & Worley, A. C. 1996. The comparative biology of pollination and mating in flowering plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 351: 1271-1280.
- Beardsley, P. M., Yen, A. & Olmstead, R. G. 2003. AFLP phylogeny of *Mimulus* section *Erythranthe* and the evolution of hummingbird pollination. *Evolution* 57: 1397-1410.
- Blomberg, S. P. & Garland, T. Jr. 2002. Tempo and mode in evolution: phylogenetic inertia, adaptation and comparative methods. *J. Evol. Biol.* 15: 899-910.
- Boggan, J. K. 1991. A morphological study and cladistic analysis of *Sinningia* and associated genera with particular reference to *Lembocarpus*, *Lietzia*, *Paliavana* and *Vanhouttea* (Gesneriaceae: Gloxinieae). Master thesis of Cornell University, Ithaca, 179p.
- Bruneau, A. 1997. Evolution and homology of bird pollination syndromes in *Erythrina* (Leguminosae). *Amer. J. Bot.* 84: 54-71.
- Burt, B. L. & Wiehler, H. 1995. Classification of the family Gesneriaceae. *Gesneriana* 1: 1-4.
- Campbell, D. 1989. Measurements of selection in a hemaphroditic plant: variation in male and female pollination success. *Evolution* 43: 318-334.

- Campbell, D. 1996. Evolution of floral traits in a hermaphroditic plant: field measurements of heritabilities and genetic correlations. *Evolution* 50: 1442-1453.
- Chautems, A., Baracho, G. S. & Siqueira-Filho, J. A. 2000. A new species of *Sinningia* (Gesneriaceae) from northeastern Brazil. *Brittonia* 52: 49-53.
- Diniz-Filho, J. A. F. 2000. Métodos filogenéticos comparativos. Editora Holos, Ribeirão Preto, SP. 162p.
- Endress, P. K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press. 511p.
- Freitas, L. 2002. Biologia da polinização em campos de altitude no Parque Nacional da Serra da Bocaina, SP. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo.
- Grant, V. & Grant, K. A. 1965. Flower pollination in the phlox family. Columbia Univ. Press, New York. 180p.
- Grant, V. 1994. Modes and origin of mechanical and ethological isolation in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 3-10.
- Hapeman, J. R. & Inoue, K. 1997. Plant-pollinator interactions and floral radiation in *Platanthera* (Orchidaceae). In: Molecular evolution and adaptive radiation. T.J. Givnish & K.J. Sytsma ed., Cambridge University Press. p. 433-454.
- Hartmann, S., Nason, J.D. & Bhattacharya, D. 2002. Phylogenetic origins of *Lophocereus* (Cactaceae) and the senita cactus-senita moth pollination mutualism. *Amer. J. Bot* 89: 1085-1092.
- Hodges, S. A. 1997. Rapid radiation due to a key innovation in columbines (Ranunculaceae: *Aquilegia*). In: Molecular evolution and adaptive radiation. T.J. Givnish & K.J. Sytsma ed., Cambridge University Press. p. 391-405.
- Johnson, S.D., Linder, H.P. & Steiner, K.E. 1998. Phylogeny and radiation of pollination system in *Disa* (Orchidaceae). *Amer. J. Bot.* 85(3): 402-411.
- Larson, B.M.H. & Barrett, S. C.H. 2000. A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biol. J. Linn. Soc.* 69: 503-520.
- Lloyd, D. G. & Barret C. H. (eds.). 1996. Floral biology: studies on floral evolution in animal pollinated plants. Chapman & Hall, New York. 410p.
- McDade, L. A. 1992. Pollinator relationships, biogeography, and phylogenetics. *BioScience* 42: 21-26.

- Moeller, M. & Cronk, Q. C. B. 1997. Origin and relationships of *Saintpaulia* (Gesneriaceae) based on ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Amer. J. Bot.* 84: 956-965.
- Morales, E. 2000. Estimating phylogenetic inertia in *Tithonia* (Asteraceae): a comparative approach. *Evolution* 54: 475-484.
- Pellmyr, O. 2002. Pollination by animal. *In: Plant-animal interactions: an evolutionary approach*. Herrera, C.M. & Pellmyr, O. Eds. Blackwell Science Ltd. Oxford. p. 157-184.
- Perret, M., Chautems, A., Spichiger, R., Geoffrey, K. and Savolainen, V. 2003. Systematics and evolution of tribe Sinningieae (Gesneriaceae): evidences from phylogenetic analyses of six plastid DNA regions and nuclear NCPGS. *Am. J. Bot.* 90: 445-460.
- Perret, M., Chautems, A., Spichiger, R., Peixoto, M. and Savolainen, V. 2001. Nectar sugar composition in relation to pollination syndromes in Sinningieae (Gesneriaceae). *Ann. Bot.* 87: 267-273.
- Roalson, E. H., Skog, L. E. & Zimmer, E. A. 2003. Phylogenetic relationships and the diversification of floral form in *Achimenes* (Gesneriaceae). *Syst. Bot.* 28: 593-608.
- Roalson, E. H., Sinters, A. E., Skog, L. E. & Zimmer, E. A. 2002. A morphological cladistic analysis of the Neotropical flowering plant genus *Gasteranthus* (Gesneriaceae). *Syst. Bot.* 27: 573-591.
- Sazima, I., Buzato, S. & Sazima, M. 1996. An assemblage of hummingbird-pollinated flowers in a montane forest in southeastern Brazil. *Bot. Acta* 109: 149-160.
- Sazima, M., Vogel, S., Prado, A. L., Oliveira, D. M., Franz, G. & Sazima, I. 2001. The sweet jelly of *Combretum lanceolatum* flowers (Combretaceae): a cornucopia resource for bird pollinators in Pantanal, western Brazil. *Plant Syst. Evol.* 227: 195-208.
- Smith, J. F. & Atkinson, S. 1998. Phylogenetic analysis of the tribes Gloxinieae and Gesnerieae (Gesneriaceae): data from *ndhF* sequences. *Am. J. Bot.* 84: S232-243.
- Smith, J. F. 1996. Tribal relationships within Gesneriaceae: a cladistic analysis of morphological data. *Syst. Bot.* 21: 497-513.
- Smith, J. F. 2000. Phylogenetic signal common to three data set: combining data which initially appear heterogeneous. *Plant Syst. Evol.* 221: 179-198.
- Smith, J. F., Wolfram, J. C., Brown, K. D., Carroll, C. L. and Denton, D. S. 1997. Tribal relationship in the Gesneriaceae: evidence from DNA sequences of the chloroplast gene *ndhF*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 50-66.

- Snow, D.W. & Teixeira, D. 1982. Hummingbirds and their flowers in the coastal mountains of SE Brazil. *Journal für Ornithologie* 123: 446-450.
- Stebbins, G. L. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I. pollination mechanisms. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1: 307-326
- Vasconcelos, M. F. & Lombardi, J. A. 2001. Hummingbird and their flowers in the campos rupestres of southern Espinhaço Range, Brazil. *Melopsittacus* 4: 3-30.
- Vogel, S. 1969. Chiropterophilie in der neotropischen Flora. II. *Flora* 158: 185-222.
- Vogel, S. 1990. Radiación adaptativa del síndrome floral en las familias neotropicales. *Bol. Ac. Nac. Cienc. Córdoba* 59: 7-30.
- Weller, S. G. & Sakai, A.K. 1999. Using phylogenetic approaches for the analysis of plant breeding system evolution. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30: 167-199.
- Wiehler, H. 1983. A synopsis of the Neotropical Gesneriaceae. *Selbyana* 6: 1-219.
- Zimmer, E. A., Roalson, E. H., Skog, L. E., Boggan, J. K. & Idnurm, A. 2002. Phylogenetic relationships in the Gesnerioideae (Gesneriaceae) based on nrDNA ITS and cdDNA trnL-F and trnE_T spacer region sequences. *Amer. J. Bot.* 89: 296-311.

CAPÍTULO I

NON-EUGLOSSINE BEES ALSO FUNCTION AS POLLINATORS OF *SINNINGIA* SPECIES (GESNERIACEAE) IN SOUTHEASTERN BRAZIL¹

ABSTRACT

Pollination by male and female Euglossine bees, euglossophily, was suggested for a number of Neotropical Gesneriaceae species. Information about other bee species than Euglossine as pollinators of neotropical members of this family is limited, and in the tribe Sinningieae data about bee-pollination are still lacking. Here we report on floral biology and bee-pollination of four *Sinningia* species: *S. schiffneri*, *S. eumorpha*, *S. villosa* and *Sinningia* “canastrensis”. The flower features, as corolla size, shape and colour, are very different among the four species but all conform to the melittophilous syndrome. The average nectar volume, and sugar amount is low in *S. schiffneri*, *S. eumorpha* and *Sinningia* “canastrensis”, when compared to that of *S. villosa*, but low nectar amounts is general feature of *Sinningia* species. The main pollinators of the four species are: small Tapinotaspidini (*Trigonopedia ferruginea*) of *S. schiffneri*, large Bombini (*Bombus morio*) and large Centridini (*Epicharis morio*) of *S. eumorpha*, large Euglossini (*Eulaema cingulata* and *Eufriesea surinamensis*) of *S. villosa*, and large Euglossini (*Eufriesea violascens*) and Megachilini (*Megachile* sp.) of *Sinningia* “canastrensis”. Out of the four species only *S. villosa* is exclusively Euglossini pollinated. The marked differences of flower features and nectar production of these *Sinningia* species may reflect their pollination by distinct groups of bees. These results strengthen the idea of multiple origins of the pollination systems involving bees within this genus, which is highly supported by molecular phylogenetic analyses.

Key words: Gesneriaceae, *Sinningia*, floral biology, pollination, non-euglossine bees, nectar production, melittophily.

¹ San Martin-Gajardo I. & Sazima M. 2004. *Plant Biology* (aceito em 01/2004)

Introduction

Gesneriaceae is a medium to large tropical family comprising about 3000 species in 140 genera (Burt and Wiehler, 1995; Smith *et al.*, 1997). The family is divided into three sub-families: Cyrtandroideae Endl. which is primarily paleotropical, Gesnerioideae Dumort. which is neotropical and Coronantheroideae Wiehler which occurs in South Pacific Islands, Northeast Australia and Chile (Burt and Wiehler, 1995). In Brazil, Gesneriaceae comprises 23 genera and about 220 species that mostly occur in rain forests in the Amazon region or in Atlantic coast (Chautems, 1991; pers. com.).

Wiehler (1983) estimated that about 60 % of the Neotropical Gesneriaceae are hummingbird-pollinated, about 30 % are pollinated by male and female Euglossine bees in search of nectar (gynandro-euglossophily) and 10 % by other modes of pollination, including andro-euglossophily (male Euglossine bees gathering fragrances). Euglossine bees as pollinators of Gesneriaceae was confirmed by Dressler (1968) and Wiehler (1977, 1978) on a few Central and Andean species of *Gloxinia*, *Nautilocalyx* and *Drymonia*. A first report about other bee species than Euglossine as pollinators of neotropical Gesneriaceae was made by Steiner (1985), who recorded *Epicharis* species (Anthophoridae) as pollinators of *Drymonia serrulata*.

The tribe Sinningieae (Gesnerioideae) comprises about 80 species which are mostly ornithophilous (Chautems, 2002). Based on a set of floral characters, Perret *et al.* (2001) suggest nine melittophilous species in this tribe, but, there is no information on pollination biology. This paper reports on floral biology and bee-pollination of *Sinningia schiffneri* Fritsch, *S. eumorpha* H.E. Moore, *S. villosa* Lindl. and *Sinningia* “canastrensis” Chautems sp. nov. ined. (in prep.), as well as on the breeding system of *S. schiffneri* and *S. eumorpha*, and supports the view that differences in floral morphology favor different groups of bees as pollinators of these species.

Materials and Methods

Sinningia schiffneri was studied at the Parque Estadual da Serra do Mar, Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba (23° 46'S - 46° 18'W; about 890 m a.s.l.) and in Ubatuba (23° 30'S - 45° 09'W, at sea level), São Paulo. *S. eumorpha* was studied at two sites, eight kilometers distant each other (22° 23'S - 47° 53'W and 22° 25'S - 47° 59'W about 920 m a.s.l.) in Itirapina, São Paulo. *S. villosa* was studied in São João de Petrópolis, Espírito Santo

(19° 48' S - 40° 41'W; about 180 m a.s.l.), and *Sinningia* “canastrensis” was studied at the Parque Nacional da Serra da Canastra, São Roque de Minas, Minas Gerais (20° 15' S - 46° 25' W; about 820 m a.s.l.).

Phases of anthesis and other floral attributes (e.g. dimensions and colour) were observed *in situ*. Pollen viability was estimated by cytoplasmic staining, using the aceto-carmin technique (Radford *et al.*, 1974). Stigmatic receptivity was tested using the H₂O₂ catalase activity method (Zeisler, 1938). Corolla measures (effective length cf. Wolf *et al.*, 1976) were taken from fresh flowers sampled from different individuals. Vouchers are deposited at the Herbarium of the Universidade Estadual de Campinas (UEC).

Flower buds were bagged at pre-anthesis and nectar availability was determined after 24 h. Two variables were measured: volume of nectar with a graduated microliter syringe (Hamilton, Nevada, USA), and sugar concentration (percent sucrose, w/w) with a pocket refractometer (Atago HSR 500, Japan). The amount of sugar was expressed in milligrams and calculated after Bolten *et al.* (1979). We compared total nectar volume, nectar sugar concentration and total sugar produced for *S. schiffneri*, *S. eumorpha*, *S. villosa* and *S. “canastrensis”* by ANOVA test and Scheffé post-hoc test at the 0.05 significance level.

The breeding system of *S. schiffneri* and *S. eumorpha* was assessed by hand-pollination treatments with previously bagged flowers (self-pollination and cross-pollination), and bagged buds (spontaneous self-pollination), and by open pollinated flowers (control), following methods outlined in Radford *et al.* (1974).

Direct visual observations of bee visitors were made from 7.00 h to 18.00 h and photographs were taken to analyze their visiting behavior. Observations on *S. schiffneri* were made during September and December 2000, and November to December 2001, totalling 70 h. *S. eumorpha* was observed in February 2000 and January 2001, totalling 54 h, and *S. villosa* and *Sinningia* “canastrensis” were observed respectively in January 2002 (21 h of observations) and January 2003 (20 h of observations). Collected bees are deposited in the Museu de História Natural - Universidade Estadual de Campinas, Coleção de Entomologia Jesus de Santiago Moure - Universidade Federal do Paraná and Museu de Entomologia da Universidade do Norte Fluminense.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Results

Plant characteristics and flowering phenology

The studied *Sinningia* species grow in clusters of 5 to 30 individuals. *Sinningia schiffneri* is a 0.5 to 1.5 m tall shrub without developed tubers, and is common in wet forests. *S. eumorpha* is a tuberous herb with rosette habit (*sensu* Chautems & Weber 1999) and *S. villosa* is a tuberous shrub, 1.0 to 1.5 m tall, both species grow on rocky outcrops in semi-deciduous forests. *Sinningia* “canastrensis” is a tuberous shrub, 0.3 to 0.6 m tall, growing on montane rocky outcrops, so called “campos rupestres” (*sensu* Giulietti and Pirani, 1988). The main flowering period of these species is during the wet season: *S. schiffneri* flowered mainly from October to December, however some flowers were recorded from September to April on individuals of the coastal areas and *S. eumorpha*, *S. villosa* and *Sinningia* “canastrensis” flowered once a year, from December to February, with a flowering peak in January. Number of flowers open per day per plant varied from 1-3 for *S. schiffneri*, 1-5 for *S. villosa* and *Sinningia* “canastrensis”, and 1-7 for *S. eumorpha*.

Floral characteristics and breeding system

Flowers of the four species are zygomorphic, have broad limbs with a large inferior petal and conspicuous nectar guides. *Sinningia schiffneri* presents trumpet-shaped flowers with a somewhat short corolla and a narrow opening (Table 1). Its flowers are white with dark magenta dots (Fig. 1A) and yellow stripes on the lower corolla surface. The funnel-shaped flowers of *S. eumorpha* have the longest corolla and the widest opening (Table 1), its colour varies from white to lilac, and greenish-yellow stripes and violet lines are on the lower surface of the corolla (Fig. 1B). *S. villosa* flowers are tubular and its corolla is of moderate length (Table 1), being light yellow coloured (Fig. 1C) with magenta dots inside and partially outside. The funnel-shaped corolla of *Sinningia* “canastrensis” is also of moderate length (Table 1), violet red in colour and with white and magenta stripes on the lower corolla surface (Fig. 1D). No odor was perceivable in the flowers of these species.

In each species stamens and styles are quite equal in length (in the male and female phases, respectively), but are shorter than the corolla (Table 1), so that anthers and stigmas are inside the flower. The four connate anthers of *S. schiffneri*, *S. eumorpha* and *Sinningia* “canastrensis” are parallel to the longest corolla axis (Fig. 2A, B), whereas in *S. villosa* the anthers are perpendicularly positioned to this axis, occupying the center of the corolla tube and



Figure 1. Bee-pollinated *Sinningia* species in southeastern Brazil. Flowers of *Sinningia schiffneri* (A), *S. eumorpha* (B), *S. villosa* (C) and *S. "canastrensis"* (D). Note shape, colour and width of the corolla. *Trigonopedia ferruginea* visiting *S. schiffneri* (E), *Bombus morio* on *S. eumorpha* (F), in both bee species the pollen is deposited on the dorsal part of the thorax. *Eufriesea surinamensis* with pollen on the forehead visiting *S. villosa* (G).

almost blocking the flower mouth (Fig. 2C). The flowers open mainly in the morning and some of them throughout the day, last five to six days and show marked protandry combined with herkogamy. During the first three days the flowers are in the male phase; the pollen is somewhat sticky and its viability is about 90 %. From the fourth day on the anthers bent down slowly, the style elongates to place the now receptive stigma in the same place the anthers occupied earlier, characterizing the female phase. From the fifth or sixth day on the corolla withers. An intermediate reproductive phase (hermaphrodite) can occur in flowers where the pollen is not removed (unvisited ones), and in this case self pollination is possible. Fruit set from autonomous self-pollination in *S. schiffneri* did not occur and in *S. eumorpha* it was low, whereas fruit set from both self- and cross-hand pollinations was similar to that from open pollinations in both species (Table 2).

Table 1. Floral features of bee-pollinated species of *Sinningia* in southeastern Brazil. Measures in millimeters. Different letters indicate significant differences among species (p<0.05) according to Scheffé post-hoc test.

Floral features	<i>S. schiffneri</i> (n=31)	<i>S. eumorpha</i> (n=19)	<i>S. villosa</i> (n=20)	<i>S. "canastrensis"</i> (n=11)
Corolla length	23 ± 1.2 ^a	51 ± 7.2 ^b	34 ± 1.8 ^c	33± 2.8 ^c
Corolla opening	5 ± 0.5 ^a	14 ± 1.6 ^b	8 ± 1.0 ^c	12 ± 1.2 ^c
Stamen length – male phase	13 ± 1.0 ^a	22 ± 2.1 ^b	24 ± 1.4 ^c	23 ± 0.3 ^c
Style length – female phase	13 ± 1.8 ^a	21 ± 4.8 ^b	24 ± 2.7 ^c	24 ± 0.4 ^c
Nectar volume (µl)	1.3 ± 1.2 ^a	2.3 ± 1.6 ^a	11.3 ± 6.5 ^b	2.3 ± 2.7 ^a
Nectar concentration (%w/w)	22.1 ± 5.6 ^a	29.2 ± 8.3 ^b	38.5 ± 1.3 ^c	29.0 ± 4.1 ^{ab}
Sugar amount (mg)	0.3 ± 0.3 ^a	0.8 ± 0.1 ^a	6.2 ± 1.5 ^b	1.3 ± 0.9 ^a

The nectary in *S. schiffneri* consists of five separate glands of equal size (Fig. 2A), in *S. eumorpha* of two separate dorsal glands (Fig. 2B), in *S. villosa* of a double-connate dorsal gland and a small ventral gland (Fig. 2C) and in *Sinningia* “canastrensis” of five glands, one double-connate dorsal gland, two small lateral and one ventral glands. These glands surround the base of the ovary and access to the nectar must be gained through small openings of the filaments. The average daily nectar volume was low in *S. schiffneri*, *S. eumorpha* and *Sinningia*

“canastrensis”, and high in *S. villosa* which differed significantly from the former species (ANOVA, $F = 40$; $M = 11.2$; $p < 0.05$ - Table 1). Mean nectar concentration varied from 22 to 38% and these values differed significantly among the species (ANOVA, $F = 22.6$; $p < 0.05$). According to it, *S. villosa* is different to the remaining species (38.5% vs. <30%), *S. schiffneri* is different to *S. eumorpha* but *S. “canastrensis”* is similar to *S. schiffneri* and *S. eumorpha* (Table 1). The sugar amount was also higher in *S. villosa*, differing significantly from the other species (ANOVA, $F = 140.8$, $M = 6.2$; $p < 0.05$ - Table 1).

Table 2. Percentage of fruit-set from autonomous, hand self- and cross-pollination and open pollination of *Sinningia schiffneri* and *S. eumorpha* flowers. Figures in parenthesis are number of fruits/number of flowers.

Treatments	<i>S. schiffneri</i>	<i>S. eumorpha</i>
Autonomous self-pollination	0 (0/43)	8 (2/24)
Hand self-pollination	57 (8/14)	56 (14/25)
Hand cross-pollination	50 (9/18)	61 (16/26)
Open pollination (control)	44 (36/81)	69 (18/26)

Flower visitors

Sinningia schiffneri flowers were visited by six species of bees (Table 3). The most frequent was *Trigonopedia ferruginea* whose individuals are small and to take nectar they enter in the corolla, contacting anthers and stigmas with the dorsal part of the head and thorax (Fig. 2A), where a large load of pollen may adhere (Fig. 1E). At each visiting bout to *S. schiffneri* a bee may visit 2 -3 flowers of the same individual and subsequently flowers of other individuals in the population. *T. ferruginea* is the main pollinator of *S. schiffneri* due its size, behavior and frequency. *Ceratinula* sp. 1 and *Ceratina* sp. 1 collected only pollen from *S. schiffneri* and, although frequent visitors (Table 3) they were not recorded visiting flowers in the female phase, but occasionally may pollinate flowers in the hermaphrodite phase. *Bombus brasiliensis* and *Euglossa cordata* visited one to two flowers per individual in search of nectar. These bees did not contact the reproductive organs and their frequency was very low (Table 3). *Augochlora* sp. pierced the corolla on the base to take nectar (Table 3).

Sinningia eumorpha flowers received visits by eight bee species (Table 3). *Bombus morio*, *Epicharis morio* and *Eufriesea* sp. are large species, but when foraging for nectar they

enter the corolla, touching anthers and stigmas with the dorsal part of the thorax (Fig. 2B), where the pollen adheres (Fig. 1F). During each visiting bout they may visit 3 - 8 flowers of different individuals in sequence. *B. morio* and *E. morio* are the main pollinators of *S. eumorpha*, whereas *Eufriesea* sp. is a secondary pollinator due to its low visiting frequency (Table 3).

Table 3. Bee visitors of *Sinningia* species in southeastern Brazil. Abbreviations: N = nectar; P = pollen; MP = main pollinator; SP = secondary pollinator; EP = eventual pollinator; NR = nectar robber; PR = pollen robber. In brackets are the range of number flowers observed on each population.

Species	Sub-tribe	Genera	Visits N ^a	Reward	Role in pollination
<i>S. schiffneri</i>	<i>Tapinotaspidini</i>	<i>Trigonopedia ferruginea</i>	25	N	MP
(20-80)	<i>Ceratinini</i>	<i>Ceratinula</i> sp. 1/ <i>Ceratina</i> sp. 1	20	P	PR/EP
	<i>Bombini</i>	<i>Bombus brasiliensis</i>	5	N	NR
	<i>Euglossini</i>	<i>Euglossa cordata</i>	4	N	NR
	<i>Augochlorini</i>	<i>Augochlora</i> sp.	14	N	NR
<i>S. eumorpha</i>	<i>Bombini</i>	<i>Bombus morio</i>	13	N	MP
(10-40)	<i>Centridini</i>	<i>Epicharis morio</i>	11	N	MP
	<i>Euglossini</i>	<i>Eufriesea</i> sp.	4	N	SP
	<i>Tapinotaspidini</i>	<i>Paratetrapedia</i> aff. <i>velutina</i>	4	N	NR
	<i>Augochlorini</i>	<i>Augochloropsis</i> sp.	4	N	NR
	<i>Meliponini</i>	<i>Plebeia</i> sp.	3	P	PR
	<i>Ceratinini</i>	<i>Ceratinula</i> sp. 2	3	P	PR
	<i>Apini</i>	<i>Apis mellifera</i>	13	P	PR
<i>S. villosa</i>	<i>Euglossini</i>	<i>Eulaema cingulata</i>	13	N	MP
(25-30)	<i>Euglossini</i>	<i>Eufriesea purpurata</i>	11	N	MP
	<i>Euglossini</i>	<i>Euglossa</i> sp.	1	N	NR
	<i>Meliponini</i>	<i>Tetragonisca</i> sp.	5	P	PR
<i>S. "canastrensis"</i>	<i>Euglossini</i>	<i>Eufriesea violascens</i>	5	N	MP
(20-30)	<i>Megachilini</i>	<i>Megachile</i> sp.	2	N	MP
	<i>Ceratinini</i>	<i>Ceratina</i> sp. 2	4	N	NR

^a Visits to plant populations.

Other visitors to *S. eumorpha* were *Paratetrapedia* aff. *velutina* and *Augochloropsis* sp., which take nectar but are too small to contact stamens and stigmas, and *Plebeia* sp., *Ceratinula* sp. 2 and *Apis mellifera*, which visit only staminate flowers to collect pollen (Table 3). *S. villosa* was visited by four bee species: *Eulaema cingulata*, *Eufriesea surinamensis*, *Euglossa* sp. and *Tetragonisca* sp. (Table 3). Males and females of *Eul. cingulata* and *Euf. surinamensis* were the most frequent visitors (Table 3). These large bees usually only inserted the head in the corolla and when taking nectar they contact stamens and stigmas with the forehead, where pollen is deposited (Figs. 1G, 2C). Visits began early in the morning and continued throughout the day until late afternoon, with intervals of 40 - 60 minutes, visiting 2-15 flowers of different individuals in a sequence. These bee species were the main pollinators of *S. villosa*. *Euglossa* sp. was occasionally seen at the flowers, hovering and facing several flowers, but made only one visit to probe for nectar. *Tetragonisca* sp. visited only staminate flowers to collect pollen.

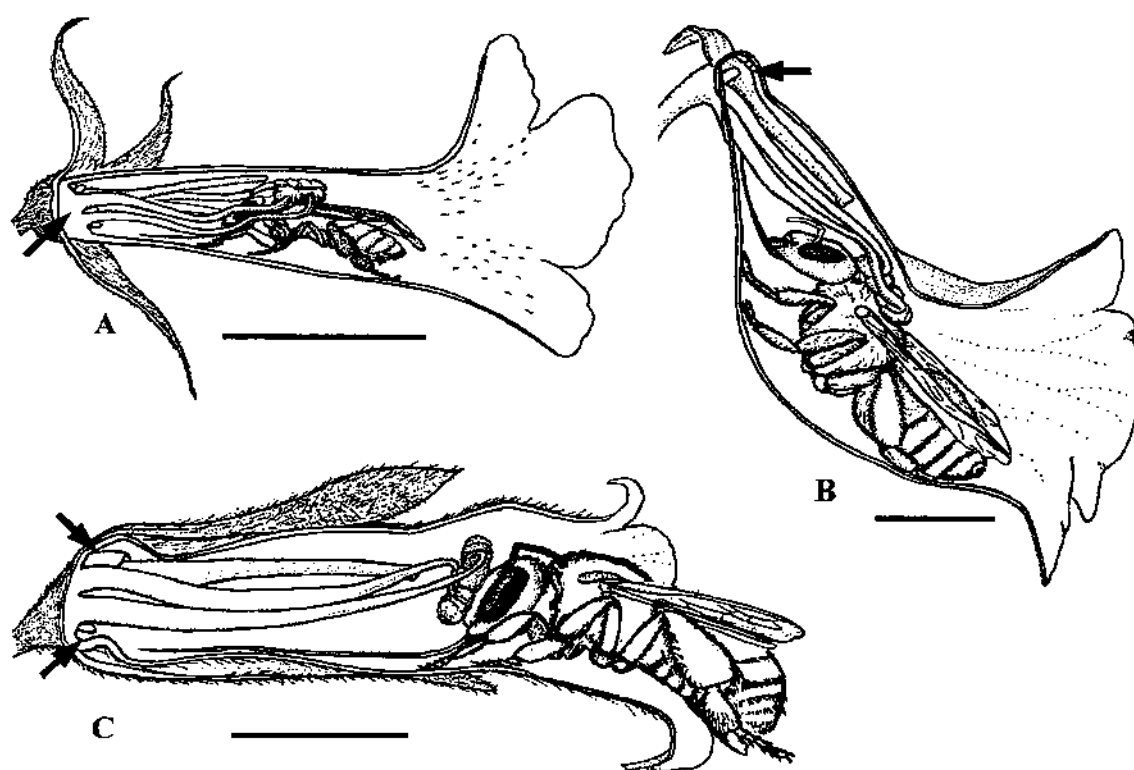


Figure 2. Side view of *Sinningia* flowers in male phases (part of the calyx and corolla removed) in southeastern Brazil. In *Sinningia schiffneri* (A) and *S. eumorpha* (B) anthers contact *Trigonopedia ferruginea* and *Bombus morio* on the thorax. In *S. villosa* (C) *Eufriesea surinamensis* contacts the anthers which have a perpendicular position in the corolla. Note the nectary glands at the corolla base (arrows).

Visits to *Sinningia* “canastrensis” occurred only early in the morning and the observed bee species were: *Eufriesea violascens* (females), *Megachile* sp. and *Ceratina* sp. 2 (Table 3). The first two species entered into the flower and during nectar feeding they contacted stamens and stigmas with the dorsal part of the thorax where pollen adheres, and they visited two or three flowers of different individuals in sequence. Both species were the main pollinators of *Sinningia* “canastrensis”. *Ceratina* sp. 2 also enters in the flower, but is too small to contact stamens and stigmas during nectar intake.

Discussion

The four *Sinningia* species have an annual reproductive phenological pattern (*sensu* Newstrom *et al.*, 1994), as is commonly found in species of the tribe Sinningieae. The long flowering period of the *S. schiffneri* population in Ubatuba is a common pattern in coastal areas with low climatic seasonality (SanMartin-Gajardo and Morellato, 2003). The flowering strategy of the four species is characteristic of the steady state type as defined by Gentry (1974), and has been related to plant species dependent on pollinators that visit flowers in a regular sequence, such as Euglossine (Janzen, 1971) or *Bombus* species (Heinrich, 1976).

General floral features of these *Sinningia* species, such as zygomorphy, color, corolla with a large inferior petal and nectar guides, as well as hidden nectar, correspond to the melittophilous syndrome (Faegri and van der Pijl, 1980), but special attributes to support the euglossophilous system of Wiehler (1983) are hardly evident. Size and shape of the corolla in the studied species seem to determine which bees are appropriate pollinators, while body size, tongue length of bee visitors are the features which influence their pollinating capability. Thus, in *S. schiffneri* only small bees (5 – 8 mm body length), and in *S. eumorpha* and *Sinningia* “canastrensis” only large bees (14 – 18 mm body length) have the adequate dimensions to match with flower size. On the other hand, in *S. villosa* where the anthers block the mouth of the flowers only long-tongued bees are able to act as pollinators. These features resemble those designed by Steiner (1985) who pointed out that effective pollination of *Drymonia* flowers depends on pollinator size.

Although self-compatible, *S. schiffneri* and *S. eumorpha* are basically pollinator-dependent. Self-compatibility also occurs in other *Sinningia* species (Clayberg 1968) and in other species of the tribe Sinningieae (I. SanMartin-Gajardo, pers. obs.), but autonomous self-pollination is rare because protandry combined with herkogamy prevents it (SanMarin-Gajardo

and Freitas 1999). Autonomous self-pollination, however, was recorded in cultivated individuals of *S. pusilla* (Clayberg 1996), which has very small bee-pollinated flowers.

The number of nectary glands was very diverse in the studied species and reflect the multiple origins within the tribe, as suggested by Perret *et al.* (2003). Differences in nectar features between *S. villosa* and the other three species, seem to be related to the different groups of pollinating bees. High nectar volume, concentration and sugar amount, as found for *S. villosa*, is expected for flowers adapted to Euglossine pollination, since these bees forage long distances along a feeding route (Janzen, 1971) and consume relatively large quantities of nectar (Dressler, 1982). However, the nectar features of *Sinningia* “canastrensis” and behavior of the Euglossine pollinator, are not typical for trapliners (Janzen, 1971), which may be related to the adverse climatic conditions (mist, low temperatures and strong, constant winds) of the montane rocky outcrops where this species occurs (Faria, 1994).

The mean nectar volume of the studied species is slightly lower than the mean values for tropical species pollinated by bees (Opler, 1983), but low nectar production of *Sinningia* species seems to be a general feature of the genus regardless of the pollinator agent, since the mean volume of ornithophilous *Sinningia* species is also very low (6,0 μ l for *S. douglasii* (Lindl.) Chautems, Sazima *et al.*, 1996; 2,3 μ l for *S. allagophylla* (Mart.) Wiehler, L. Freitas pers. comm.; 2,6 μ l for *S. tuberosa* (Mart.) H.E. Moore, 4,5 μ l for *S. cochlearis* (Hook.) Chautems and 10,0 μ l for *S. gigantifolia* Chautems, I. SanMartin Gajardo, in prep.). Nectar concentration of these species, however, conforms to the average values for tropical bee pollinated species (Opler, 1983), in contrast to that for the ornithophilous *Sinningia* species, whose nectar concentration is lower than the average value for this syndrome (I. SanMartin-Gajardo, pers. obs.). Perret *et al.* (2001) found great similarity on nectar volume, sugar composition and concentration for both bee and hummingbird flowers of *Sinningieae* species. According to Perret *et al.* (2001), switches between these pollination syndromes on the tribe have thus relied on characters linked to flower display and to accessibility of the reward rather than on nectar characteristics.

The pollinators of the *Sinningia* species here studied belong to several groups of bees, namely Tapinotaspidini, Bombini, Centridini, Euglossini and Megachilini, with three of the four species pollinated by non-Euglossine bees. This is inconsistent with the proposal of Wiehler (1983), based on flower size, corolla shape and color that Euglossine would be pollinators of all bee-pollinated neotropical Gesneriaceae. Previous studies, based on occasional and restricted

field records for eight Gesnerioideae species (Dressler, 1968; Wiehler, 1977, 1978) had indeed supported that view. Pollination by distinct groups of bees as found in this study reflect the marked differences in floral morphology present in these species. Such variability may indicate multiple origins within the genus for pollination systems involving bees, an idea highly supported by molecular phylogenetic analyses of 76 species of the Sinningieae (Perret *et al.*, 2003). The four species here studied each belong to a different lineage of the monophyletic clades within this tribe as recognized by Perret *et al.* (2003). Such a scenario indicates that the approximately twenty melittophilous species, in the predominantly ornithophilous Sinningieae tribe, may correspond to a series of independent changes toward bee pollination.

Acknowledgements

We thank P. Gibbs, I. A. Santos, A. Chautems, S. Buzato, L. Freitas and two anonymous reviewers for comments and improvements to the manuscript; I. A. Santos, M. C. Gaglianone and A. J. C. Aguiar for bee identification; A. M. F. Pacheco for fine drawing of figure 2; Instituto de Botânica de São Paulo and IBAMA for allowing work at the Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba and PARNA Serra da Canastra, respectively. Essential financial support was provided by FAPESP and CNPq.

References

- Bolten, A. B., Feinsinger, P., Baker, H. and Baker, R. (1979) On the calculation of sugar concentration in flower nectar. *Oecologia* 41, 301 - 304.
- Burt, B. L. and Wiehler, H. (1995) Classification of the family Gesneriaceae. *Gesneriana* 1, 1 - 4.
- Chautems, A. (1991) A família Gesneriaceae na região cacauera da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 14, 51 - 59.
- Chautems, A. and Weber, A. (1999) Shoot and inflorescence architecture of the neotropical genus *Sinningia* (Gesneriaceae). In *The evolution of plant Architecture* (Kurmman, M. H. and Hemsley, A. R., eds.), London Kew: Royal Botanic Gardens, pp. 305 - 332.
- Chautems, A. (2002) New Gesneriaceae from Minas Gerais, Brazil. *Candollea* 56, 261 - 279.
- Clayberg, C. D. (1996) Interspecific hybridization in *Sinningia* (Gesneriaceae). *Baileya* 23, 184 - 194.

- Clayberg, C. D. (1968) Biosystematic studies in *Sinningia* and *Rechsteineria* (Gesneriaceae). *American Journal of Botany* 55, 829 - 833.
- Dressler, R. L. (1968) Observations on orchids and Euglossine bees in Panama and Costa Rica. *Revista de Biologia Tropical* 15, 143 - 183.
- Dressler, R. L. (1982) Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review in Ecology and Systematics* 13, 373 - 294.
- Faegri, K. and van der Pijl, L. (1980) *The principles of pollination ecology*. Oxford: Pergamon Press.
- Faria, G. M. (1994) A flora e a fauna apícola de um ecossistema de campo rupestre, Serra do Cipó, MG, Brasil: composição, fenologia e suas interações. Universidade Estadual Paulista - Rio Claro: PhD thesis.
- Gentry, A. H. (1974) Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica* 6, 64 - 68.
- Giulietti, A. M. and Pirani, J. R. (1988) Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In *Proceeding of a workshop on Neotropical distribution patterns*. (Hever W. R. and Vanzolini P. F., eds.), Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, pp. 39 - 69.
- Heinrich, B. (1976) The foraging specializations of individual bumblebees. *Ecological Monographs* 46, 105 - 128.
- Janzen, D. H. (1971) Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science* 171, 203 - 205.
- Kochmer, J. P. and Handel, S. (1986) Constraints and competition in the evolution of flowering phenology. *Ecological Monographs* 56, 303 - 325.
- Newstrom, L. E., Frankie, G. W. and Baker, H. G. (1994) A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* 26, 141 - 159.
- Opler P. A. (1983) Nectar production in a tropical ecosystem. In *The biology of nectaries* (Bentley, B. and Elias, T., eds.), New York: Columbia University Press, pp. 30 - 79.
- Perret, M., Chautems, A., Spichiger, R., Peixoto, M. and Savolainen, V. (2001) Nectar sugar composition in relation to pollination syndromes in *Sinningieae* (Gesneriaceae). *Annals of Botany* 87, 267 - 273.

- Perret, M., Chautems, A., Spichiger, R., Kite, G. and Savolainen, V. (2003) Systematics and evolution of tribe Sinningieae (Gesneriaceae): evidences from phylogenetic analyses of six plastid DNA regions and nuclear NCPGS. *American Journal of Botany* 90, 445 - 460.
- Radford, A. E., Dickinson, W. C., Massey, J. R. and Bell, C. R. (1974) Vascular plant systematics. New York: Harper and Tow Publishing.
- SanMarin-Gajardo, I. and Freitas, L. (1999) Hummingbird pollination in *Besleria longimucronata* Hoehne (Gesneriaceae) in south-eastern Brazil. *Biociências* 7, 13 - 24.
- SanMartin-Gajardo, I. and Morellato, L. P. C. (2003) Fenologia de Rubiaceae do sub-bosque em floresta Atlântica no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 26, 299 - 309.
- Sazima, I., Buzato, S. and Sazima, M. (1996) An assemblage of hummingbird-pollinated flowers in a montane forest in southeastern Brazil. *Botanica Acta* 109, 149 - 160.
- Smith, J. F., Wolfram, J. C., Brown, K. D., Carroll, C. L. and Denton, D. S. (1997) Tribal relationship in the Gesneriaceae: evidence from DNA sequences of the chloroplast gene *ndhF*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84, 50 - 66.
- Steiner, K. E. (1985) The role of nectar and oil in the pollination of *Drymonia serrulata* (Gesneriaceae) by *Epicharis* bees (Anthophoridae) in Panama. *Biotropica* 17, 217 - 229.
- Wiehler, H. (1977) New genera and species of Gesneriaceae from the Neotropics. *Selbyana* 2, 67 - 132.
- Wiehler, H. (1978) The genera *Episisa*, *Alsobia*, *Nautilocalyx* and *Paradrymonia* (Gesneriaceae). *Selbyana* 5, 11 - 60.
- Wiehler, H. (1983) A synopsis of the Neotropical Gesneriaceae. *Selbyana* 6, 1 - 219.
- Wolf, L. L., Stiles F.G. and Hainsworth F.R. (1976) Ecological organization of a highland tropical hummingbird community. *Journal of the Animal Ecology* 32, 349 - 379.
- Zeisler, M. (1938) Über die Abgrenzung der eigentlichen Narbenfläche mit Hilfe von Reaktionen. *Beihefte zum Botanischen Zentralblatt* 58, 308 - 318.

CAPÍTULO II

BIOLOGIA FLORAL E POLINIZAÇÃO POR BEIJA-FLORES EM ESPÉCIES DE *VANHOUTTEA* E *SINNINGIA* (GESNERIACEAE) NO SUDESTE DO BRASIL¹

ABSTRACT – (Floral biology and hummingbird pollinated species of *Vanhouttea* and *Sinningia* (Gesneriaceae) in southeastern Brazil). Hummingbird pollination was suggested to *Sinningia* e *Vanhouttea* species based on floral features. However, information about pollination biology is still lacking. Here we report on floral biology and hummingbird-pollination of three *Vanhouttea* species and three *Sinningia* species. The flowers are tubular, red and scentless. The pairwise comparison of floral measurement two groups be formed: *V. hilariana*, *V. brueggeri* and *S. gigantifolia* bigger than *V. calcarata*, *S. cochlearis* and *S. tuberosa*. The nectar volume secreted during 24 hours by *Vanhouttea* species ($21.8 \pm 13.2 \mu\text{l}$) was significantly different and higher to *Sinningia* species ($6.3 \pm 5.7 \mu\text{l}$). As well, the sugar amount produced by *Vanhouttea* species ($6.1 \pm 3.9 \text{ mg}$) was higher than *Sinningia* ($1.8 \pm 1.6 \text{ mg}$). These differences on nectar production may be correlated with the distinct size of nectary glands in both genera. The hummingbirds *Leucochloris albicollis*, *Stephanoxis lalandi*, *Clytolaema rubricauda* (Trochilinae), *Phaethornis pretrei* and *P. eurynome* (Phaethornithinae) were the main pollinators of *Vanhouttea* and *Sinningia* species. The group of hummingbird pollinators (Trochilinae or Phaethornithinae) seems to be determined by the habitat of each species, while the frequency of visits seems to be mainly determined by the nectar features.

Key words - Sinningiaceae, Trochilinae, Phaethornithinae, nectar, nectary

RESUMO – (Biologia floral e polinização por beija-flores em espécies de *Vanhouttea* e *Sinningia* (Gesneriaceae) no sudeste do Brasil). Com base nas características florais é inferida a polinização por beija-flores na maioria das espécies de *Sinningia* e *Vanhouttea*, entretanto, informações detalhadas sobre a biologia da polinização são restritas a poucas espécies. Neste estudo são apresentadas as observações sobre a biologia da polinização e as espécies de beija-flores polinizadores, relacionando as características do néctar com o comportamento desses beija-flores em três espécies *Vanhouttea* e três espécies de *Sinningia*. As flores são tubulares, avermelhadas e inodoras. Elas formam dois grupos morfológicos em relação ao comprimento e

¹ conforme formato da Revista Brasileira de Botânica

o diâmetro do tubo da corola sendo, *V. hilariana*, *V. brueggeri* e *S. gigantifolia* maiores significativamente que *V. calcarata*, *S. cochlearis* e *S. tuberosa*. O volume secretado durante 24 horas pelas espécies de *Vanhouttea* ($21,8 \pm 13,2\mu\text{l}$) é significativamente diferente e maior que nas espécies de *Sinningia* ($6,3 \pm 5,7\mu\text{l}$). Assim como, a quantidade de açúcares produzida por *Vanhouttea* é mais alta ($6,1 \pm 3,9 \text{ mg}$) e difere significativamente das espécies de *Sinningia* ($1,8 \pm 1,6 \text{ mg}$). Estas diferenças nas características do néctar pode estar relacionado com a variação do tamanho das glândulas nectaríferas entre os dois gêneros. Cinco espécies de beija-flores, *Leucochloris albicollis*, *Stephanoxis lalandi*, *Clytolaema rubricauda* (Trochilinae), *Phaethornis pretrei* e *P. eurynome* (Phaethornithinae), são os principais polinizadores das espécies de *Vanhouttea* e *Sinningia* estudadas. O grupo de beija-flores polinizadores (Trochilinae ou Phaethornithinae) em cada espécie parece ser determinado pelo hábitat da planta, mais do que pelo tamanho do tubo da corola. Enquanto, a frequência de visitas dos beija-flores às flores parece ser determinada, principalmente, pelas características do néctar.

Palavras-chave: Sinningieae, Trochilinae, Phaethornithinae, néctar, nectário

INTRODUÇÃO

Com base em dados moleculares foi proposto recentemente que os gêneros *Sinningia*, *Vanhouttea* e *Paliavana* formam uma tribo monofilética, denominada Sinningieae (Smith *et al.* 1997; Zimmer *et al.* 2002). Esta tribo possui centro de diversidade no sudeste brasileiro e é constituída por aproximadamente 80 espécies (Perret *et al.* 2003). Dados de filogenia molecular demonstram que *Vanhouttea* e *Paliavana* são parafiléticos, sendo sugerida a inclusão das espécies desses gêneros em *Sinningia* (Smith *et al.* 1997; Perret *et al.* 2003). Entretanto, novas modificações sistemáticas neste grupo ainda não são possíveis, devido a que certos clado na filogenia com base em dados moleculares são fracamente sustentados, por exemplo, o clade *Sinningia* BS 56% (Perret *et al.* 2003) e à variação morfológica grande destes gêneros (Chautems com. pers.). Neste contexto, estudos comparativos da biologia floral de espécies de *Vanhouttea* e *Sinningia* e a sua relação com os polinizadores podem subsidiar dados para auxiliar no esclarecimento da tendência evolutiva destes gêneros dentro de Sinningieae.

Espécies nesta tribo possuem flores tubulosas a campanuladas, na sua grande maioria de coloração avermelhada e com variação na forma e no número de nectários. Com base nas características florais tais como, forma da corola, coloração e ausência de odor, é inferida a

polinização por beija-flores em todas as espécies de *Vanhouttea* e em aproximadamente 67% de *Sinningia* (Perret *et al.* 2003). Entretanto, estudos sobre a biologia da polinização e o sistema reprodutivo na família Gesneriaceae são escassos (Endress 1994; Franco & Buzato 1992), havendo informações esparsas sobre algumas espécies (Buzato *et al.* 2000; Sazima *et al.* 1996). Em adição, existe variação grande das glândulas nectaríferas nas espécies de *Vanhouttea* e *Sinningia*, o que é também característico da família Gesneriaceae (Wiehler 1983). As causas para a proliferação de formas do nectário na família não são claras até o momento (Wiehler 1983), e há poucos estudos que correlacionem as diversas formas de nectário com a produção de néctar e/ou o tipo de polinizador.

Tendo em vista estes aspectos, os objetivos específicos deste estudo são: (i) comparar as características florais entre *Vanhouttea hilariana*, *V. brueggeri* e *V. calcarata*, e *Sinningia tuberosa*, *S. gigantifolia* e *S. cochlearis*; (ii) determinar as espécies de beija-flores polinizadores; (iii) relacionar as características morfológicas das flores e da produção de néctar com o grupo e a frequência dos beija-flores polinizadores.

MATERIAL E MÉTODOS

As espécies *Sinningia tuberosa*, *Vanhouttea hilariana* e *V. brueggeri* foram estudadas no Parque Estadual do Ibitipoca, MG (21°42'S – 43°53'W), a 1300 m de altitude. *S. gigantifolia*, *V. calcarata* e *S. cochlearis* foram estudadas no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, RJ (22°27'S – 43°01'W), em diferentes altitudes (1460, 1750 e 2100 m, respectivamente) na trilha de acesso à Pedra do Sino. Exsicatas dessas espécies foram depositadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC) como material testemunho.

Informações sobre horário de abertura, duração da flor, bem como mudanças de posição das estruturas florais foram registradas através de observação direta no campo em 10 flores previamente marcadas. Atributos florais, tais como posição da flor na planta, dimensões, formato, odor e cor, foram registrados *in situ* e fotografados. A viabilidade do pólen foi estimada através da contagem de grãos corados por carmim acético (Radford *et al.* 1974). A receptividade do estigma foi verificada com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 20 vol. (Zeisler 1938). Para verificar o sistema reprodutivo botões foram marcados e ensacados, após a antese foram submetidos aos seguintes tratamentos: polinização cruzada, autopolinização manual e espontânea. Para os experimentos de polinização cruzada foram utilizadas flores emasculadas na

pré-antese. Além desses tratamentos, flores foram marcadas e mantidas em condições naturais (controle). Em todos os tratamentos foi quantificado o número de frutos formados.

Para o estudo da morfologia dos nectários foram coletadas flores de diferentes indivíduos e fixadas em FAA (número de flores amostradas por espécie na Tabela 1). As glândulas nectaríferas de cada flor foram medidas com auxílio de lupa (Leica MZ8) provida de escala na ocular. A altura (A), largura (L) e espessura (E) de cada glândula foram utilizadas para calcular o tamanho do nectário de cada flor ($A \times L \times E$) e apresentado em mm^3 (modificado de Davis *et al.* 1996). O néctar foi coletado uma única vez em flores previamente ensacadas por 24 horas (no mínimo 30 flores por espécie), as quais se encontravam em diferentes fases (feminina e masculina). O volume do néctar foi medido utilizando micro-seringa e a concentração de açúcares foi medida com auxílio de refratômetro manual Atago (0 – 90%). A concentração do néctar foi transformada para cálculo da produção de açúcar em gramas (Bolten *et al.* 1979).

A existência de diferenças significativas nas dimensões da corola e no nectário, no volume e na concentração de néctar e na quantidade de açúcares entre as seis espécies, bem como na produção de néctar entre as fases feminina e masculina foram verificadas através de análise de variância (ANOVA). O teste de Scheffé foi aplicado *pos hoc* para as variáveis significativamente diferentes (Zar 1996). O teste de correlação de Pearson foi usado para confirmar a relação entre o tamanho do nectário e a secreção de néctar (volume e quantidade de açúcares).

As espécies de beija-flores visitantes foram observadas à vista desarmada ou com auxílio de binóculos, durante o início, o pico e o fim da floração das espécies. Foram registrados o horário, a frequência e a duração das visitas, bem como o comportamento dos beija-flores ao explorar as flores, sua permanência ou não nas proximidades da planta e as interações com indivíduos da mesma ou de outras espécies de beija-flores. Identificações dos beija-flores foram confirmadas através das descrições e ilustrações em Grantsau (1989).

RESULTADOS

Características das plantas e biologia floral - *Vanhouttea hilariana* e *V. brueggeri* são espécies arbustivas e ocorrem principalmente em afloramentos rochosos em áreas abertas, entretanto, há alguns agrupamentos destas espécies que ocorrem em borda de mata. Estas espécies apresentam floração longa (três a seis meses) e sincrônica de novembro a maio. *V. calcarata* também é um arbusto (Fig. 1A) que ocorre em afloramentos rochosos em áreas abertas e floresce

aproximadamente por três meses, de fevereiro a abril. *Sinningia cochlearis* é uma planta herbácea e ocorre em locais sombreados entre rochas de granito nos campos de altitude (ca. 2000 m – Fig. 1C). A floração de *S. cochlearis* é curta, cerca de um mês, janeiro a fevereiro. *Sinningia tuberosa* e *S. gigantifolia* ocorrem em paredões rochosos próximos a cursos de água ou matas ciliares e florescem por um período longo (quatro a seis meses) de janeiro a junho e de janeiro a abril, respectivamente.

As flores de *Vanhouttea hilariana*, *V. brueggeri* (Fig. 3B) e *V. calcarata* são axilares, isoladas ou com até quatro flores por axila e cada indivíduo pode apresentar de 10 a 30 flores por dia, dependendo do porte da planta. As três espécies de *Sinningia* apresentam tubérculos



Figura 1. Hábito arbustivo de *Vanhouttea calcarata* (A) e detalhe das flores axilares (B). Indivíduo de *Sinningia cochlearis* (C) com duas inflorescências e várias flores abertas. *S. gigantifolia* (D) e detalhe da flor masculina com as anteras na parte superior da abertura da corola (E). *S. tuberosa* note que os pedúnculos das florações anteriores permanecem no indivíduo (F).

Tabela 1 - Atributos florais das espécies de *Vanhouttea* e *Sinningia* da Serra do Ibitipoca, MG e da Serra dos Órgãos, RJ. Os valores numéricos representam média \pm desvio padrão. O número de flores (n) é igual para comprimento e diâmetro do tubo da corola, e para concentração e quantidade de açúcares. As letras sobrescritas mostram o resultado *pos hoc* da ANOVA (Scheffé test). Letras diferentes indicam que os atributos diferem significativamente entre as espécies.

Espécie	<i>V. hilariana</i>	<i>V. brueggeri</i>	<i>V. calcarata</i>	<i>S. gigantifolia</i>	<i>S. cochlearis</i>	<i>S. tuberosa</i>
Comprimento do tubo da corola (mm)	36,6 \pm 2,5 ^a (n=30)	35,9 \pm 2,4 ^a (n=30)	28,6 \pm 2,4 ^b (n=37)	38,9 \pm 3,5 ^a (n=34)	26,7 \pm 1,8 ^b (n=35)	28,1 \pm 2,9 ^b (n=31)
Diâmetro do tubo da corola (mm)	4,7 \pm 1,1 ^a	5,3 \pm 0,8 ^a	3,4 \pm 0,8 ^b	5,0 \pm 0,6 ^a	3,9 \pm 0,7 ^b	3,2 \pm 0,6 ^b
Volume de néctar (ml)	19,5 \pm 10,0 ^a (n=30)	21,2 \pm 11,6 ^a (n=30)	24,1 \pm 16,3 ^a (n=37)	10,4 \pm 5,6 ^b (n=27)	7,0 \pm 6,1 ^b (n=31)	2,6 \pm 1,8 ^b (n=32)
Açúcares (mg)	6,0 \pm 3,3 ^a	6,4 \pm 4,0 ^a	6,0 \pm 4,4 ^a	2,5 \pm 1,6 ^b	2,0 \pm 1,9 ^b	0,9 \pm 0,7 ^b
Concentração de açúcares (%)	28,1 \pm 3,7 ^a (n=30)	26,9 \pm 3,2 ^{ab} (n=30)	23,1 \pm 6,4 ^b (n=37)	22,4 \pm 2,8 ^b (n=27)	22,5 \pm 5,3 ^b (n=27)	25,7 \pm 8,6 ^{ab} (n=25)
Tamanho do nectário (mm ³)	4,1 \pm 1,5 ^a (n=10)	4,8 \pm 1,7 ^a (n=10)	4,3 \pm 1,1 ^a (n=10)	1,9 \pm 0,5 ^b (n=10)	2,4 \pm 0,8 ^b (n=16)	1,4 \pm 0,5 ^b (n=14)

bem desenvolvidos dos quais brotam os caules que, em *S. cochlearis* mede de 5 a 50 cm de altura e sustenta uma a cinco inflorescências do tipo racemo (Fig. 1C) que podem apresentar de 10 a 50 flores por dia, e em *S. gigantifolia* mede de 0,3 a 1 m de comprimento e cada indivíduo desenvolve uma ou duas inflorescências do tipo racemo de cimeira, que podem apresentar 3 a 10 flores por dia (Fig. 1D e E). Em *S. tuberosa* as flores brotam isoladamente de diferentes gemas do tubérculo, possuem pedúnculo de 10 a 15 cm e cada indivíduo apresenta de 1 a 20 flores por dia (Fig. 1F).

O comprimento e o diâmetro do tubo da corola de *V. hilariana*, *V. brueggeri* e *S. gigantifolia* são significativamente maiores que em *V. calcarata*, *S. cochlearis* e *S. tuberosa* (ANOVA, $F_{comp}=115,9$; $F_{diam}= 43,2$; $p<0,05$), separando as espécies em dois grupos morfológicos (Tabela 1). As seis espécies apresentam antese diurna e protandria combinada com hercogamia (i.e., separação temporal e espacial das estruturas reprodutivas). As flores das espécies de *Vanhouttea* duram aproximadamente cinco dias e em *Sinningia* apenas dois a três dias. No início da antese, as anteras estão localizadas na parte superior da abertura da corola, caracterizando a fase masculina da flor (Fig. 1E). O pólen em mássulas é retirado gradativamente, durante as visitas dos beija-flores, e aos poucos os filetes começam a murchar retraindo as anteras. Nesta ocasião, o estilete aumenta em comprimento e o estigma torna-se evidente, ocupando o lugar das anteras e caracterizando a fase feminina da flor. O estigma está receptivo durante toda a antese (desde o início da abertura do botão até a queda do tubo da corola), entretanto, após o alongamento do estilete ocorre aumento da superfície receptiva. Os grãos de pólen apresentam cerca de 99% de viabilidade durante toda a antese. Os resultados dos tratamentos de polinização controlada indicam que as três espécies de *Vanhouttea* e *S. tuberosa* são auto-compatíveis, uma vez que desenvolveram frutos nos tratamentos de autopolinização (Tabela 2). A porcentagem de frutos produzidos é semelhante em todos os tratamentos, no entanto autopolinização espontânea não ocorre (Tabela 2).

Tabela 2 – Frutos maduros (%) produzidos a partir de polinizações manuais na três espécies de *Vanhouttea* e *Sinningia tuberosa* (número de frutos/número de flores polinizadas em parênteses).

Tratamentos	<i>V. hilariana</i>	<i>V. brueggeri</i>	<i>V. calcarata</i>	<i>S. tuberosa</i>
Polinização cruzada	52 (12/23)	45 (9/20)	50 (5/10)	47 (8/17)
Autopolinização	52 (11/21)	41 (9/22)	43 (6/14)	30 (6/20)
Autopolinização espontânea	0 (0/30)	0 (0/30)	0 (0/20)	0 (0/11)
Controle	67 (16/24)	43 (13/30)	60 (9/15)	39 (7/18)

Nectários e néctar - Os nectários estão localizados na base da corola e apresentam marcada variação inter- e intra-específica no número e na disposição das glândulas nas seis espécies estudadas (Fig. 2). Nas três espécies de *Vanhouttea* o nectário é formado por cinco glândulas separadas em mais de 75% das flores examinadas ($n = 30$ em cada espécie), e nas flores restantes por duas glândulas dorsais fundidas e três separadas ao redor do ovário (Fig. 2A). O tamanho do nectário nas três espécies é de aproximadamente $4,5 \text{ mm}^3$ (Tabela 1). As flores de *Sinningia cochlearis* apresentam variação no número e na disposição das glândulas nectaríferas: pode ocorrer uma glândula dorsal grande, ou esta em conjunto com uma glândula ventral (35% das flores examinadas, $n = 23$), ou glândulas dorsal e ventral em conjunto com duas glândulas laterais pequenas (30% das flores examinadas - Fig. 2B). Em *S. gigantifolia* e *S. tuberosa* há uma glândula dorsal na maioria das flores e 30% das flores apresentam uma ventral pequena, além da glândula dorsal (Fig. 2C). O tamanho médio do nectário nas espécies de *Sinningia* é significativamente menor que em *Vanhouttea* (Tabela 1).

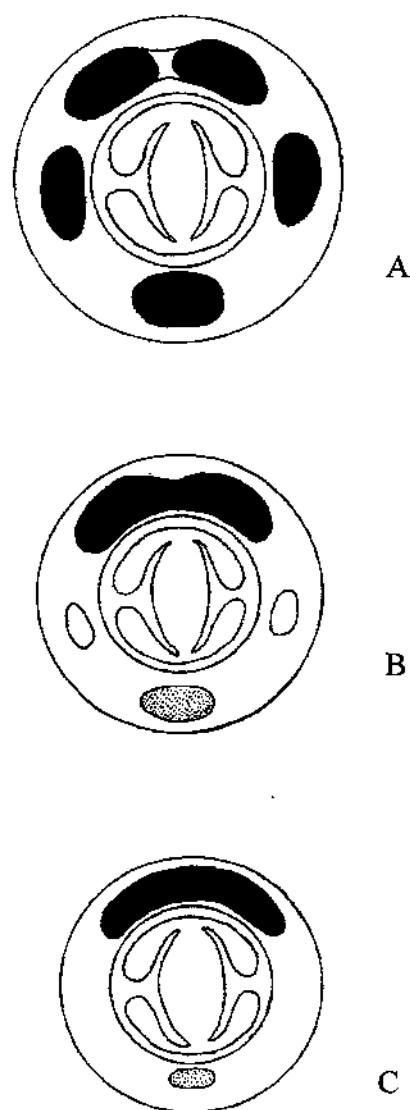


Figura 2. Forma dos nectários das três espécies de *Vanhouttea* (A), *Sinningia cochlearis* (B) e *S. gigantifolia* e *S. tuberosa* (C). Glândulas em preto são predominantes nas flores analisadas (ca. de 75%), no restante das flores ocorrem formas em branco e achureado.

O néctar é produzido desde a pré-antese até a queda da corola e se acumula em uma câmara de néctar pequena na base da corola. O volume de néctar produzido não apresentou diferença significativa entre as fases feminina e masculina nas seis espécies. Entretanto, o volume secretado por dia pelas três espécies de *Vanhouttea* (média = 21,8 ± 13,2µl) foi maior que nas espécies de *Sinningia* (média = 6,3 ± 5,7µl), sendo estes valores significativamente diferentes entre si (ANOVA F = 24,2; p<0,05; Tabela 1). A quantidade de açúcares nas espécies de *Vanhouttea* é mais alta (média = 6,1 ± 3,9 mg) e difere significativamente das espécies de *Sinningia* (média = 1,8 ± 1,6 mg; ANOVA F =17,4; p<0,05; Tabela 1), embora a variação na concentração de açúcares no néctar das espécies de *Vanhouttea* e *Sinningia* não forme dois grupos claramente distintos (Tabela 1). O tamanho do nectário apresentou correlação positiva com os valores de volume de néctar (r = 0,60; p < 0,05) e quantidade de açúcares (r = 0,58; p < 0,05) nas seis espécies.

Visitantes florais - Cinco espécies de beija-flores foram os principais polinizadores das espécies de *Vanhouttea* e *Sinningia* (Tabela 3). Durante a visita às flores os beija-flores podem permanecer de 1 a 4 segundos para sorver o néctar e contatar as estruturas reprodutivas com a fronte (Fig. 3B) ou com a base da maxila (Fig. 3F).

Tabela 3 – Frequência de visitas dos beija-flores às espécies de *Vanhouttea* e *Sinningia* na Serra do Ibitipoca (MG) e na Serra dos Órgãos (RJ). O primeiro número refere-se à quantidade de visitas e o número entre parêntesis à frequência relativa de visitas (%) por espécie de planta.

Espécies	<i>V. hilariana</i>	<i>V. brueggeri</i>	<i>V. calcarata</i>	<i>S. gigantifolia</i>	<i>S. cochlearis</i>	<i>S. tuberosa</i>
Trochilinae						
<i>Leucochloris albicollis</i>	26 (62)	20 (39)	14 (34)	-	3 (50)	-
<i>Stephanoxis lalandi</i>	-	-	16 (39)	-	1 (16,6)	-
<i>Clytolaema rubricauda</i>	-	-	5 (12)	-	2 (33,4)	-
Phaethornithinae						
<i>Phaethornis pretrei</i>	5 (12)	9 (18)	-	-	-	8 (61,5)
<i>Phaethornis eurynome</i>	6 (14)	18 (35)	6 (15)	19 (100)	-	4 (30,8)
Não identificado	5 (12)	4 (8)	-	-	-	1 (7,7)
Horas de observação	44	58	30	30	25	50
Frequência de visitas	0,95	0,88	1,4	0,63	0,24	0,26

Em cada turno de visita estas aves podem explorar de 2 a 30 flores da mesma planta ou de indivíduos próximos. Os indivíduos de *Vanhouttea hilariana* e *V. brueggeri* que estão localizados em áreas abertas foram visitados, predominantemente, por *Leucochloris albicollis* (Fig. 3A, Tabela 3). Esta espécie de beija-flor apresentou comportamento territorialista, expulsando outros beija-flores que se aproximavam dos agrupamentos de *Vanhouttea*; além disso, vocalizava intensamente enquanto pousado próximo às plantas. Os indivíduos de *Vanhouttea* que estão próximos à borda da mata foram, freqüentemente, visitados por *Phaethornis pretrei* e *P. eurynome* (Fig. 3B, Tabela 3). Estas espécies de beija-flores realizaram visitas ao longo do dia e mantiveram intervalos de visita de 50 a 70 minutos, o que caracteriza o comportamento de forrageamento em linhas de captura. Em *V. calcarata*, os beija-flores *Stephanoxis lalandi* e *L. albicollis* (Fig. 3C) foram os principais polinizadores, seguidos de *Phaethornis eurynome* e *Clytolaema rubricauda* (Tabela 3). A frequência de visitas dos beija-flores às populações de *Vanhouttea* foi alta, principalmente em *V. calcarata* (1,4 visitas/hora), em comparação às de *Sinningia* (Tabela 3).

As flores de *S. gigantifolia* foram polinizadas exclusivamente por *Phaethornis eurynome* (Fig. 3D, Tabela 3). Esta espécie de beija-flor realizava visitas ao longo do dia em intervalos regulares de aproximadamente uma hora. Os beija-flores *L. albicollis* (Fig. 3E), *C. rubricauda* e *S. lalandi* foram os polinizadores de *S. cochlearis*, ao passo que *Phaethornis pretrei* e *P. eurynome* foram os principais polinizadores de *S. tuberosa* (Fig. 3F, Tabela 3). Em *S. cochlearis* e *S. tuberosa*, a frequência de visitas dos beija-flores foi bem mais baixa do que em *S. gigantifolia* (Tabela 3), e ocorreram uma a três vezes por dia.

DISCUSSÃO

A fenologia das espécies estudadas apresenta padrão anual de floração (sensu Newstrom *et al.* 1994), comum à maioria das espécies da tribo Sinningieae (A. Chautems, com. pess.). Nas espécies de *Vanhouttea*, em *S. gigantifolia* e *S. tuberosa* a floração é longa (mais de 5 meses) e se aproxima ao tipo “steady-state” definida por Gentry (1974). Este tipo de floração é comumente associado ao comportamento “trap-line” de forrageamento, característico de algumas espécies de beija-flores (Stiles 1975; Feinsinger e Colwell 1978). As flores destas espécies produzem néctar em quantidades moderadas, obrigando os polinizadores a visitarem diversas flores e se deslocando ao longo de vários indivíduos por suas rotas de forrageamento (Janzen 1971; Heinrich e Raven

1972). Em contraste, *S. cochlearis* se diferencia das outras espécies, pois seu pico de floração é curto e apresenta muitas flores, padrão definido como “cornucopia” por Gentry (1974).

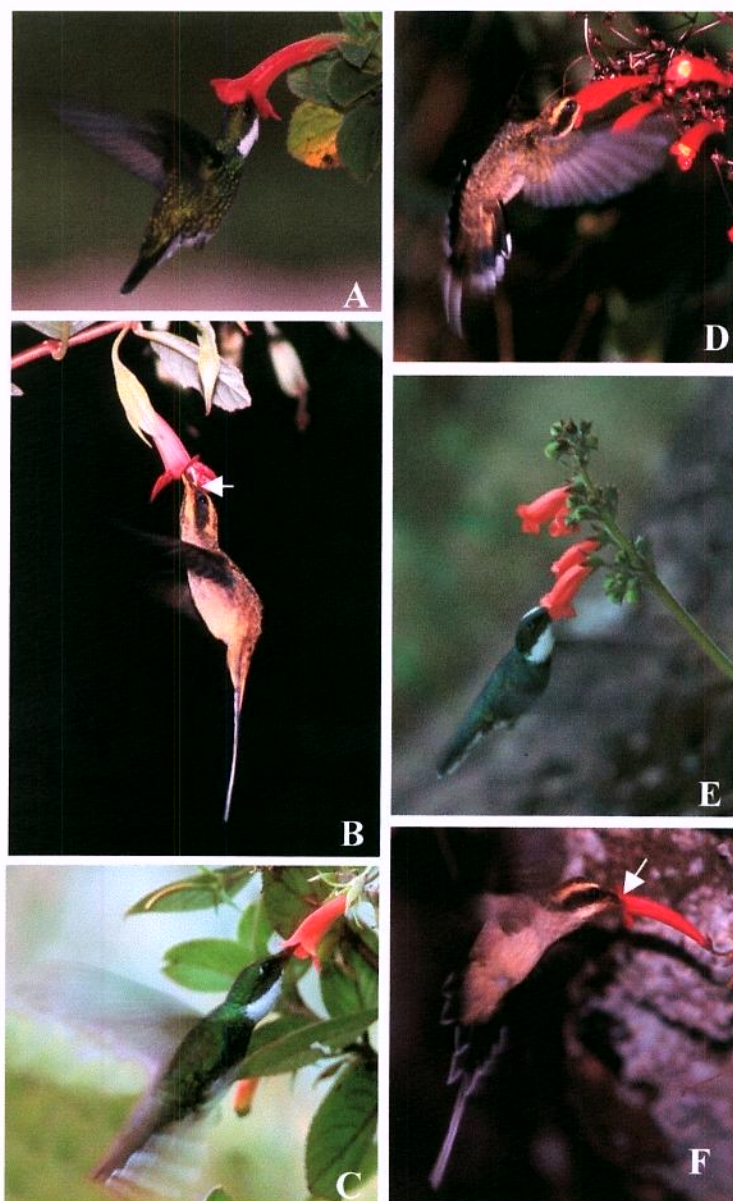


Figura 3. Beija-flor *Leucochloris albicollis* visitando flores de *Vanhouttea hilariana* (A), *V. calcarata* (C) e *S. cochlearis* (E). *Phaethornis eurynome* visitando flores de *V. brueggeri* (B), *S. gigantifolia* (D) e *S. tuberosa* (F). Note que em flores de tubo longo como em A, B e D as estruturas reprodutivas tocam a fronte, e em flores com o comprimento do tubo menor como em C, E e F, o contato ocorre na base da maxila.

Esta estratégia de floração tende a concentrar o recurso para estimular as visitas dos beija-flores, uma vez que os campos de altitude abrigam poucas espécies ornitófilas (Freitas e Sazima 2001). Nas áreas abertas das partes elevadas do bioma Floresta Atlântica, as espécies ornitófilas parecem constituir um recurso complementar para os beija-flores, que se alimentam principalmente nas áreas de floresta de altitude adjacentes (Freitas e Sazima 2001).

As flores das espécies estudadas exibem corola tubular com coloração predominantemente avermelhada, antese diurna e ausência de odor, aspectos que concordam com a definição de espécies ornitófilas de Faegri e Pijl (1980). De fato, os beija-flores *Leucochloris albicollis*, *Stephanoxis lalandi*, *Clytolaema rubricauda* (Trochilinae), *Phaethornis petrei* e *P. eurynome* (Phaethornithinae) são os principais polinizadores destas espécies de *Vanhouttea* e *Sinningia*. Estas espécies de beija-flores são comumente registradas em comunidades ornitófilas de regiões de altitude na mata Atlântica próximas ao litoral (Sazima *et al.* 1996; Buzato *et al.* 2000) e em campos rupestres (Vasconcelos e Lombardi 2001). As cinco espécies de beija-flores deste estudo sobrepõem-se no uso do recurso com pelo menos duas outras espécies de beija-flores. Entretanto, a frequência das visitas é diferente entre os beija-flores visitantes em cada espécie de planta (Tabela 3). A sobreposição no uso do recurso pode ocorrer devido ao comportamento generalista de *L. albicollis*, e em adição, ao tamanho e a morfologia das flores tornando-as acessíveis (Sazima *et al.* 1996).

A morfologia das estruturas reprodutivas e a sua mudança de posição durante a antese são muito semelhantes nas seis espécies, bem como, na maioria das espécies da tribo Sinningieae (e.g. SanMartin-Gajardo & Sazima, no prelo). Em relação aos dois grupos morfológicos distintos, a diferença no comprimento do tubo da corola parece não influenciar o grupo de beija-flores visitantes destas espécies, embora beija-flores Phaethornithinae tenham sido associados freqüentemente a polinização de flores com corola longa e Trochilinae a flores com corola curta (Stiles 1975). Por outro lado, diferenças na abertura do tubo da corola poderiam deslocar o local de deposição de pólen no corpo dos beija-flores (Buzato *et al.* 2000). De fato, em *V. brueggeri* cuja abertura da corola é ampla *Phaethornis eurynome* contata as estruturas reprodutivas principalmente com a frente (Fig. 3B), e em *S. tuberosa* cuja abertura da corola é pequena, o beija-flor contata essas estruturas com a base da maxila (Fig. 3F). Entretanto, nas espécies sincronopátricas, *V. brueggeri* e *V. hilariana*, ambas com abertura do tubo da corola ampla, a deposição de pólen ocorre na frente dos beija-flores, promovendo mistura de pólen entre estas espécies. A semelhança nos atributos florais, a sobreposição do período de floração, a proximidade das populações, somada à mistura de pólen promovida pelos beija-flores entre *V. brueggeri* e *V.*

hilariana, apóia a hipótese de Chautems (2002) que indivíduos com características intermediárias entre estas duas espécies encontrados na área de estudo sejam híbridos naturais.

A autocompatibilidade que ocorre nas três espécies de *Vanhouttea* e em *Sinningia tuberosa*, também reforça a hipótese de hibridização natural entre *V. brueggeri* e *V. hilariana*, pois segundo Ellstrand *et al.* (1996) grupos taxonômicos que possuem autocompatibilidade são predispostos à formação e manutenção de híbridos. Embora autocompatibilidade seja característica das espécies da tribo Sinningieae (Clayberg 1968; I. SanMartin-Gajardo, obs. pess.), a ausência da formação de frutos no tratamento de autopolinização espontânea indica que a protandria combinada com a hercogamia impede autopolinizações. Porém, polinizações geitonogâmicas podem ocorrer, pois freqüentemente flores em diferentes fases (masculinas e femininas) são encontradas em um único indivíduo. Neste caso, o comportamento de forrageamento em linhas de captura dos beija-flores Phaethornithinae pode ser decisivo para favorecer polinização cruzada entre estas espécies.

As espécies de *Vanhouttea* e *Sinningia* diferem quanto ao número e tamanho das glândulas do nectário. A variação na morfologia do nectário é característica de vários gêneros da família Gesneriaceae (e.g. *Kohleria* - Kvist e Skog 1992; *Gloxinia* e *Sinningia* - Wiehler 1983). As espécies de *Sinningia* ornitófilas podem apresentar principalmente duas glândulas dorsais fundidas ou separadas, ou duas glândulas dorsais grandes e três pequenas ao redor do ovário, enquanto todas as *Vanhouttea* apresentam cinco glândulas grandes ao redor do ovário (ver, Wilson 1974; Wiehler 1975; Chautems 1995, 1997). Wiehler (1983) supõe que o nectário em forma de anel ao redor do ovário seja a forma ancestral, e que a redução para duas glândulas dorsais fundidas seria uma adaptação para ornitofilia. Assim sendo, a presença de cinco glândulas em *Vanhouttea* pode ser um atributo ancestral na tribo, em contraste aos nectários reduzidos ou em menor número da maioria das *Sinningia* ornitófilas. No entanto, a variação interespecífica no número e na morfologia das glândulas nectaríferas poderia ser reflexo da plasticidade genética desta característica, tal como encontrado em espécies do gênero *Brassica* por Davis *et al.* (1996). A variação na morfologia dos nectários entre indivíduos da mesma espécie tem sido fracamente documentada em angiospermas (Davis *et al.* 1996), principalmente devido ao número pequeno de flores e de poucos espécimes utilizados em estudos sobre a morfologia dos nectários (G. Bernardello com. pess.).

O volume médio de néctar produzido pelas espécies de *Vanhouttea* é semelhante ao encontrado em espécies ornitófilas de comunidades neotropicais (Snow & Snow 1980, 1986; Arizmendi & Ornelas 1990; Sazima *et al.* 1996) e em espécies de Gesneriaceae da Costa Rica

(tribo Episcieae, Stiles & Freeman 1993). No entanto, o volume médio de néctar secretado pelas espécies de *Sinningia* estudadas é muito reduzido, semelhante ao encontrado em *S. douglasii* (6 µl, Sazima *et al.* 1996) e *S. allagophylla* (2,25µl, L. Freitas, com. pess.), e ao de outras espécies de Gesneriaceae do sudeste do Brasil polinizadas por beija-flores como, *Nemanthantus fritschii* (Franco & Buzato 1992), *N. fornix* (3 µl, Sazima *et al.* 1996) e *Besleria longimucronata* (2-5 µl, San Martin-Gajardo e Freitas 1999). A média da concentração de açúcares no néctar nas espécies estudadas é semelhante a outros conjuntos de espécies polinizadas por beija-flores em comunidades neotropicais (Snow & Snow 1986; Arizmendi & Ornelas 1990; Sazima *et al.* 1996; Buzato *et al.* 2000). No entanto, entre as espécies de *Vanhouttea* e *Sinningia* estudadas a quantidade de açúcares difere, refletindo a variação do volume secretado por estas espécies.

A correlação positiva entre tamanho de nectário, volume de néctar e quantidade de açúcares, sugere que a diferença na secreção de néctar entre as espécies de *Vanhouttea* e *Sinningia* possa estar associada ao tamanho das glândulas do nectário. Correlações positivas entre o tamanho do nectário e a quantidade de néctar também foi encontrada para alguns gêneros da família Rosaceae (Weryszko-Chmielewska *et al.* 2003; Orosz-Kovacs *et al.* 1996), bem como em várias espécies de Labiatae (Dafini *et al.* 1998). Entretanto, estudos sobre nectários em maior número de espécies de *Vanhouttea* e *Sinningia* são necessários para confirmar se estas correlações representam um padrão entre essas espécies.

Neste estudo, o grupo de beija-flores polinizadores (Trochilinae e/ou Phaethornithinae) parece ser determinado pelo hábitat de cada espécie de planta. Por exemplo, *S. gigantifolia* que cresce predominantemente em áreas de mata é polinizada exclusivamente por Phaethornithinae, enquanto *S. cochlearis* que cresce em áreas abertas é polinizada exclusivamente por Trochilinae. Ainda mais claro é o exemplo de *V. brueggeri*, que apresenta maior número de visitas de *P. eurynome* nos indivíduos que ocorrem em áreas na borda da mata, e de *L. albicollis* em áreas abertas. Por outro lado, a frequência de visitas dos beija-flores a cada espécie parece ser determinada, principalmente, pela quantidade de néctar secretado (volume e miligramas de açúcares), pois as espécies de *Vanhouttea* que produzem mais néctar são visitadas mais frequentemente que as espécies de *Sinningia* as quais secretam pequenas quantidades de néctar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIZMENDI, M.C. & ORNELAS, J.F. 1990. Hummingbirds and their floral resources in a tropical dry forest in Mexico. *Biotropica* 22: 172-180.
- BOLTEN, A.B., FEINSINGER, P., BAKER, H., BAKER, R. 1979. On the calculation of sugar concentration in flower nectar. *Oecologia* 41: 301-304.
- BUZATO, S., SAZIMA, M., SAZIMA, I. 2000. Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic Forest Sites. *Biotropica* 32: 824-841.
- CHAUTEMS, A. 1995. Taxonomic revision of *Sinningia* Nees (Gesneriaceae) III: new species from Brazil and new combinations. *Gesneriana* 1: 8-14.
- CHAUTEMS, A. 1997. New Gesneriaceae from São Paulo, Brazil. *Candollea* 52: 159-169.
- CHAUTEMS, A. 2002. New Gesneriaceae from Minas Gerais, Brazil. *Candollea* 56: 261-279.
- CLAYBERG, C.D. 1968 Biosystematic studies in *Sinningia* and *Reichsteineria* (Gesneriaceae). *American Journal of Botany* 55: 829-833.
- DAFINI, H., LENSKY, Y., FAHN, A. 1988. Flower and nectar characteristics of nine species of Labiatae and their influence on honeybee visits. *J. Apicult. Res.* 27: 103-114.
- DAVIS, A.R., FOWKE, L.C., SAWHNEY, V.K.E & LOW, N.H. 1996. Floral nectar secretion and ploidy in *Brassica rapa* and *B. napus* (Brassicaceae). II. Quantified variability of nectary structure and function rapid-cycling lines. *Annals of Botany* 77: 223-234.
- ENDRESS, P.K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Oxford: Cambridge University Press.
- ELLASTRAND, N.C., WHITKUS, R. E RIESEBERG, L.H. 1996 Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5090-5093.
- FAEGRI, K. & VAN DER PIJL, L. 1980. The principles of pollination ecology. Oxford: Pergamon Press.
- FRANCO, A.L.M. & BUZATO, S. 1992. Biologia floral de *Nematanthus fritschi* (Gesneriaceae). *Revista Brasileira de Biologia* 52: 661-666.
- FREITAS, L. & SAZIMA, M. 2001. Nectar features in *Esterhazyia macrodonta*, a hummingbird-pollinated Scrophulariaceae in southeastern Brazil. *J. Plant Res.* 114: 187-191.
- FEINSINGER, P. & COLWELL, R.K. 1978. Community organization among neotropical nectar-feeding birds. *American Zoology* 18: 779-795.
- GRANTS AU, R. 1989. Os beija-flores do Brasil. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura.

- GENTRY, A.H. 1974. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica* 6: 64-68.
- HEINRICH, B. & RAVEN, P.H. 1972. Energetics and pollination ecology. *Science* 176: 597-602.
- JANZEN, D. H. 1971. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science* 171: 203-205.
- KVIST, L.P. & SKOG, L.E. 1992. Revision of *Kohleria* (Gesneriaceae). *Smithsonian Contr. Bot.* 79: 1-83.
- NEWTROM, L.E., FRANKIE, G.W. & BAKER, H.G. 1994. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* 26: 141-159.
- OROSZ-KOVACS, Z., KAPOSVARI, F. & GULYAS, S. 1996. Structure of the floral nectary in sour cherry cultivars. *Acta Horticulturae* 410: 463-466.
- PERRET, M., CHAUTEEMS, A., SPICHIGER, R., PEIXOTO, M. & SAVOLAINEN, V. 2001. Nectar sugar composition in relation to pollination syndromes in Sinningieae (Gesneriaceae). *Annals of Botany* 87: 267-273.
- PERRET, M., CHAUTEEMS, A., SPICHIGER, R., KITE G. & SAVOLAINEN, V. 2003. Systematics and evolution of tribe Sinningieae (Gesneriaceae): evidences from phylogenetic analyses of six plastid DNA regions and nuclear NCPGS. *American Journal of Botany* 90: 445-460.
- RADFORD, A.E., DICKINSON, W.C., MASSEY, J.R. & BELL, C.R. 1974. Vascular plant systematic. New York: Harper and Tow Publishing.
- SANMARTIN-GAJARDO, I. & FREITAS, L. 1999. Hummingbird pollination in *Besleria longimucronata* Hoehne (Gesneriaceae) in southeastern Brazil. *Biociências* 7: 13-24.
- SAZIMA, I., BUZATO, S. & SAZIMA, M. 1996. An assemblage of hummingbird-pollinated flowers in a montane forest in southeastern Brazil. *Botanica Acta* 109: 149-160.
- SMITH, J.F., WOLFRAM, J.C., BROWN, K.D., CARROLL, C.L. & DENTON, D.S. 1997. Tribal relationship in the Gesneriaceae: evidence from DNA sequences of the chloroplast gene *ndhF*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 50-66.
- SNOW, D. W. & SNOW, B. K. 1980. Relationships between hummingbird and flowers in the Andes of Colombia. *Bull. Br. Mus. (Nat.Hist.), Zool. Ser.* 38: 105-139.
- SNOW, D.W. & SNOW, B.K. 1986. Feeding ecology of hummingbirds in the Serra do Mar, southeastern Brazil. *El Hornero* 12: 286-296.

- STILES, F.G. 1975. Ecology, flowering phenology, and hummingbird pollination of some Costa Rican *Heliconia* species. *Ecology* 56: 285-301.
- STILES, F.G. & FREEMAN, C.E. 1993. Patterns in floral nectar characteristics of some bird-visited plant species from Costa Rica. *Biotropica* 25: 191-205.
- VASCONCELOS, M.F. & LOMBARDI, J.A. 2001. Hummingbird and their flowers in the campos rupestre of southern Espinhaço Range, Brazil. *Melopsittacus* 4: 3-30.
- WERYSZKO-CHMIELEWSKA, E., MASIEROWSKA, M.L. & KONARSKA, A. 2003. Characteristics of floral nectaries and nectar in two species of *Crataegus* (Rosaceae). *Plant Systematic and Evolution* 238: 33-41.
- WIEHLER, H. 1975. New genera and species of Gesneriaceae from the Neotropics. *Selbyana* 5: 11-60.
- WIEHLER, H. 1983. A synopsis of the Neotropical Gesneriaceae. *Selbyana* 6: 1-219.
- WILSON, C.L. 1974. Floral anatomy in Gesneriaceae II. Gesnerioideae. *Bot. Gaz.* 135:256-268.
- ZAR, J. H. 1996. Bioestatistical analysis. Prentice-Hall, New Jersey.
- ZEISLER, M. 1938. Über die Abgrenzung der eigentlichen Narbenfläche mit Hilfe von Reaktionen. Beihefte zum Botanisches Zentralblatt 58: 308-318.
- ZIMMER, E.A., ROALSON, E.H., SKOG, L.E., BOGGAN, J.K. & IDNURM, A. 2002. Phylogenetic relationships in the Gesnerioideae (Gesneriaceae) based on nrDNA ITS and cdDNA trnL-F and trnE_T spacer region sequences. *American Journal of Botany* 89: 296-311.

CAPÍTULO III

CHIROPTEROPHILY IN SINNINGIEAE: TWO BAT-POLLINATED SPECIES AND ONE CASE POLLINATED BY HUMMINGBIRDS¹

The pollination biology of *Sinningia brasiliensis*, *Paliavana prasinata* and *P. sericiflora* was studied in southeastern Brazil. Some floral features for all three species fit on the bat-pollination syndrome: large, robust and bell-shaped corollas, greenish or yellowish-green colour with violet-brown dots, and large amount of nectar. However, other floral features - such as onset of anthesis, nectar attributes and odour intensity - differ among the species. The flowers of *Sinningia brasiliensis* and *P. prasinata* open at sunset and those of *P. sericiflora* open at any time during the day or night. Nectar volume and total sugar production increased significantly at midnight in *Sinningia brasiliensis* and *P. prasinata*, but in *P. sericiflora* both were greater during the day. In addition, there were no significant differences in the total nectar and sugar production during anthesis in *P. sericiflora*. Scent chemical composition is similar in all three species, but the odour intensity is much higher in *Sinningia brasiliensis* and *P. prasinata*. Field observations established that the flowers of *Sinningia brasiliensis* and *P. prasinata* are pollinated by glossophagine bat species, while *P. sericiflora* is pollinated only by hummingbirds. Our studies confirm that *Sinningia brasiliensis* and *P. prasinata* fit well on the chiropterophylous syndrome, and *P. sericiflora* presents floral features intermediate between hummingbird and bat syndromes.

Key words: Gesneriaceae, *Sinningia brasiliensis*, *Paliavana*, floral biology, nectar, scent, pollination, chiropterophily, ornithophily, southeastern Brazil.

INTRODUCTION

Sinningieae (Gesneriaceae) is a neotropical monophyletic tribe comprised by three genera: *Sinningia* Nees, *Vanhouttea* Lemaire and *Paliavana* Vandelli (Smith *et al.*, 1997). The majority of the species belong to the tuberous genus *Sinningia*, which is distributed throughout the Neotropics, except in the Caribbean area (Chautems & Weber, 1999). *Vanhouttea* and *Paliavana* have a narrow distribution occurring mostly in southeastern Brazil (A. Chautems pers. comm.). Based on

¹ Following *Annals of Botany* format

floral shape, colour, nectar sugar composition and scent, bees and hummingbirds were inferred as the putative pollinators for 93 % of the *Sinningieae* species by Perret *et al.* (2003). Most *Sinningia* species fit the ornithophilous syndrome as do those of *Vanhouttea* (SanMartin-Gajardo and Sazima, in prep.), whereas *Paliavana* species fit either the large bee or bat syndromes (Wiehler, 1983).

Based on the bell shape and greenish colour of the flowers, Vogel (1969) suggested that *Sinningia brasiliensis* (Regel & Schmidt) Wiehler & Chautems, *P. prasinata* (Ker-Gawler) Benth. and *P. sericiflora* Benth. were bat-pollinated. This is also supported by the low sucrose proportion found in *P. prasinata* and *S. brasiliensis* (Perret *et al.*, 2001), which is similar to that found in other Neotropical bat flowers (Baker *et al.*, 1998). However, actually there are no reports on pollination biology and visitors for species of tribe *Sinningieae*.

This paper reports observations on floral biology and pollination of *S. brasiliensis*, *P. prasinata* and *P. sericiflora* to confirm the suggestion of bat-pollination proposed by Vogel (1969) for these species.

MATERIAL AND METHODS

Study sites

Fieldwork of *Sinningia brasiliensis* and *Paliavana prasinata* was carried out at the rupicolous gardens of the Museu de Biologia Mello Leitão (MBML) and at the Estação Biológica Santa Lúcia (EBSL), both in Santa Tereza (19° 57'S and 40° 31'W, 700 m a.s.l.), Espírito Santo, SE Brazil. The annual average temperature is 20° C and annual rainfall reaches 1327 mm, with a wet season from November to March (Thomaz and Monteiro, 1997). The EBSL area is covered by montane rainforest (Oliveira-Filho and Fontes, 2000), where *Sinningia brasiliensis* and *Paliavana prasinata* individuals occur on rocky outcrops. The pollination biology of *S. brasiliensis* was studied from 14 - 20 Jan. 2002 and of *P. prasinata* from 13-16 Jul. 2000 (at the EBSL) and from 18-22 Jun. 2001 (at the MBML).

Paliavana sericiflora was studied at São Tomé das Letras (21° 50'S and 44° 52'W, 1300 m a.s.l.) and at Serra do Caraça (20° 05'S and 43° 28'W, 1200 m a.s.l.), both in Minas Gerais. The mean annual temperature is about 18° C (Nimer, 1972) and annual rainfall is up to 1600 mm with a defined wet season from October to April. *P. sericiflora* occurs on rocky outcrops at the typical montane fields, of so called "campos rupestres", a short grass savana intermixed with other

rupicolous communities (Giulietti and Pirani, 1988). The pollination biology of *P. sericiflora* was studied from 26-31 Mar. 2001 (São Tomé das Letras) and from 26-30 Jun. 2002 (Serra do Caraça).

Floral biology

Flowers were observed in situ to determine phases of anthesis, colour (following Korerup and Wanscher, 1963) and scent intensity. Pollen viability was estimated by cytoplasmic staining, using the aceto-carmin technique (Radford *et al.*, 1974). Stigmatic receptivity was tested using the H₂O₂ catalase activity method (Zeisler, 1938). Effective corolla length (cf. Wolf *et al.*, 1976) and diameter of corolla mouth were taken from fresh flowers sampled from different plants. Plant vouchers are deposited at the Herbarium of the Universidade Estadual de Campinas (UEC).

Nectar production

Nectar production was measured in flowers bagged at the pre-anthesis phase (two or three flowers per individual). Two variables were measured, volume of nectar using a graduated microliter syringe (Hamilton, Nevada, USA), and sugar concentration (percent sucrose, w/w) with a pocket refractometer (Atago HSR 500, Japan). The amount of sugar was expressed in milligrams and calculated following Bolten *et al.* (1979). Flowers were maintained bagged for 24 hours to measure the accumulated nectar. Total nectar volume, nectar sugar concentration and total sugar production was compared by one-way ANOVA test and unequal n HSD *pos-hoc* test at the 0.05 significance level.

In another group of bagged flowers, all nectar was removed from the same flower repeatedly, at 6 hours intervals for *Paliavana* species and at 8 hours for *S. brasiliensis*, starting at 1800 h on the first day of anthesis until corolla abscission. Care was taken to avoid damage to the nectaries and other flower parts. The mean per time interval of nectar volume, nectar sugar concentration and total sugar produced by *S. brasiliensis* (N = 6), *P. prasinata* (N = 7) and *P. sericiflora* (N = 9) flowers were compared by Kruskal-Wallis ANOVA test and Dunn *pos-hoc* test at the 0.05 significance level.

Floral scent

Volatile compounds of the flowers were extracted with dicloromethanic (Whitten *et al.* 1993) in five flowers of each species. The dicloromethanic layer was filtered on anhydrous NaSO₄ and gently reduced to 1µl. To identify each compound the extracts were analysed by GC-MS on a Hewlett Packard-6890 GC system with a fused capillary column (30m x 0.25mm x 0.25µm, HP-

5MS, Crossbond 5%-phenyl-95%-dimethylpolysiloxane, HP) directly coupled to Hewlett Packard 5973 a selective mass detector. Conditions: injection temperature 250°C; temperature program 40 (3 min) - 300°C, 4°C/min; splitless during 1.50 min, carrier gas He: 1ml/min, constant flow; sample volume 0.2 or 1 µl.

Pollinator observations

Direct visual observations of bat visitors were made by sky- or moonlight and photographs were taken to analyse their visiting behavior. Observations on *S. brasiliensis* were made from 1700 to 0330 h (totalling 22 h), on *P. prasinata* from 1730 to 0700 h (totalling 30 h) and on *P. sericiflora* from 1730 to 0030 h (totalling 39 hours). Hummingbird visits to *P. sericiflora* were observed from 0600 to 1800 h, totalling 30 hours.

RESULTS AND DISCUSSION

Plant habit and floral features

Sinningia brasiliensis is a tuberous, annual herb measuring 0.5 to 1.5 m tall. Tubers in *Sinningia* are considered as a key character defining the genus (Wiehler, 1983). This storage organ is found in many *Sinningia* species which are able to colonize rupicolous habitats in open or forest areas (Perret *et al.*, 2003). *Paliavana prasinata* and *P. sericiflora* are non-tuberous, perennial shrubs 1 to 3 m tall. These features are common to *Paliavana* and *Vanhouttea* species, but also occur sporadically in *Sinningia* (e. g. *S. schiffneri*, Perret *et al.* 2003). The flowering periods of the study populations occurred once a year and lasted from December to February in *S. brasiliensis*, April to August in *P. prasinata*, and February to May in *P. sericiflora*, characterizing an annual phenological pattern as defined by Newstrom *et al.* (1994).

Sinningia brasiliensis has terminal inflorescences with axillary, long stalked (35 - 70 mm) flowers (Fig. 1A). The long stalk ensure that flowers are positioned outside the foliage, which is typical of bat flowers (Faegri and Pijl, 1980). *S. brasiliensis* flowers are of the gullet-type (cf. Faegri and Pijl, 1980), with a hooded corolla (galea) formed by the fusion and expansion of two dorsal corolla lobes. Corolla mean length is 33 mm (SD = 1.9, N = 20) and the mean diameter of the corolla mouth is 18 mm (SD = 1.6, N = 20). The flowers are green coloured with violet-brown markings, which are quite variable among individuals (Fig. 1B and 1C). In both *Paliavana* species the flowers are axillary, relatively short stalked (15 - 18 mm), but very accessible for visitors, and disposed in 2-flowered cymes (Figs. 1D and 1F). The flowers of *P. prasinata* are of the gullet-type

(cf. Faegri and Pijl, 1980), green in colour with violet brown dots on the outside. Mean corolla length is 33 mm (SD = 2.3, N = 28) and its mean diameter is 17 mm (SD = 1.7, N = 30). The corolla shape and size (length and wide corolla mouth) fit well to the bat visitor insert its face or head in search of nectar (Fig. 4B), as predicted by Vogel (1969). *P. sericiflora* flowers are tubular and/or gullet-type (cf. Faegri and Pijl, 1980), green or yellowish in colour with violet brown dots inside the corolla (Fig. 1G). The variation on colour and morphology flowers occurs among individuals mainly in the Caraça population. The corolla has a mean length of 43 mm (SD = 3.6, N = 47) and a mean diameter of 16 mm (SD = 2.9, N = 30). The calyx is reddish and persistent (Fig. 1F). Some of the floral features as, gullet-type, wide opening of the corolla mouth, shape and colour are typical of the chiropterophilous syndrome (Vogel, 1969; Faegri and Pijl, 1980), whereas other features such as the reddish calyx and the long, somewhat tubular corolla, may be related to pollination by hummingbirds (Grant and Grant, 1968).

The flowers of *S. brasiliensis* and *P. prasinata* open at sunset (between 1730 and 1800 h) and often last two nights, or occasionally three nights. A short anthesis period, as in *S. brasiliensis* and *P. prasinata*, has not been reported for other Sinningieae species (SanMartin-Gajardo and Sazima, in prep.). Flowers with a two or three night longevity have been recorded for some other bat-pollinated species of diverse families (Sazima *et al.*, 1989; Machado *et al.*, 1998; Sazima *et al.*, 1999), but, one night longevity is a more common pattern (Vogel, 1969; Dobat and Peikert-Holle, 1985; Gribel *et al.* 1999). During first night (male phase), the anthers are situated at the upper rim of the corolla opening (Figs. 1B and 1E), the yellow-whitish pollen is available and its viability is ca. 90%. At this time the stigma is hidden behind the anthers and is not receptive. In the second and third night (female phase), the anthers are situated on the lower surface of the corolla and the now receptive stigma is exhibited (Figs 1C and 1E). In general lines placement and disposition of the reproductive organs follows the pattern known for Gesneriaceae (Helversen 1993; SanMartin-Gajardo and Freitas 1999). On the other hand, *P. sericiflora* flowers open irregularly during the day or night, but crepuscular anthesis is rare. So far as we know flower opening at any time is not mentioned for any other Gesneriaceae (e.g. Wiehler, 1983; Steiner, 1985), a feature which may support the intermediate situation of this species between syndromes. Anthesis sequence in this species, as well as pollen and stigma features, is similar to that found in former species, but each phase, male and female, lasts 3 – 4 days. A long anthesis period, as in *P. sericiflora*, is a more common mainly in melittophilous and ornithophilous species of the tribe Sinningieae (SanMartin-Gajardo and Sazima, in prep.).

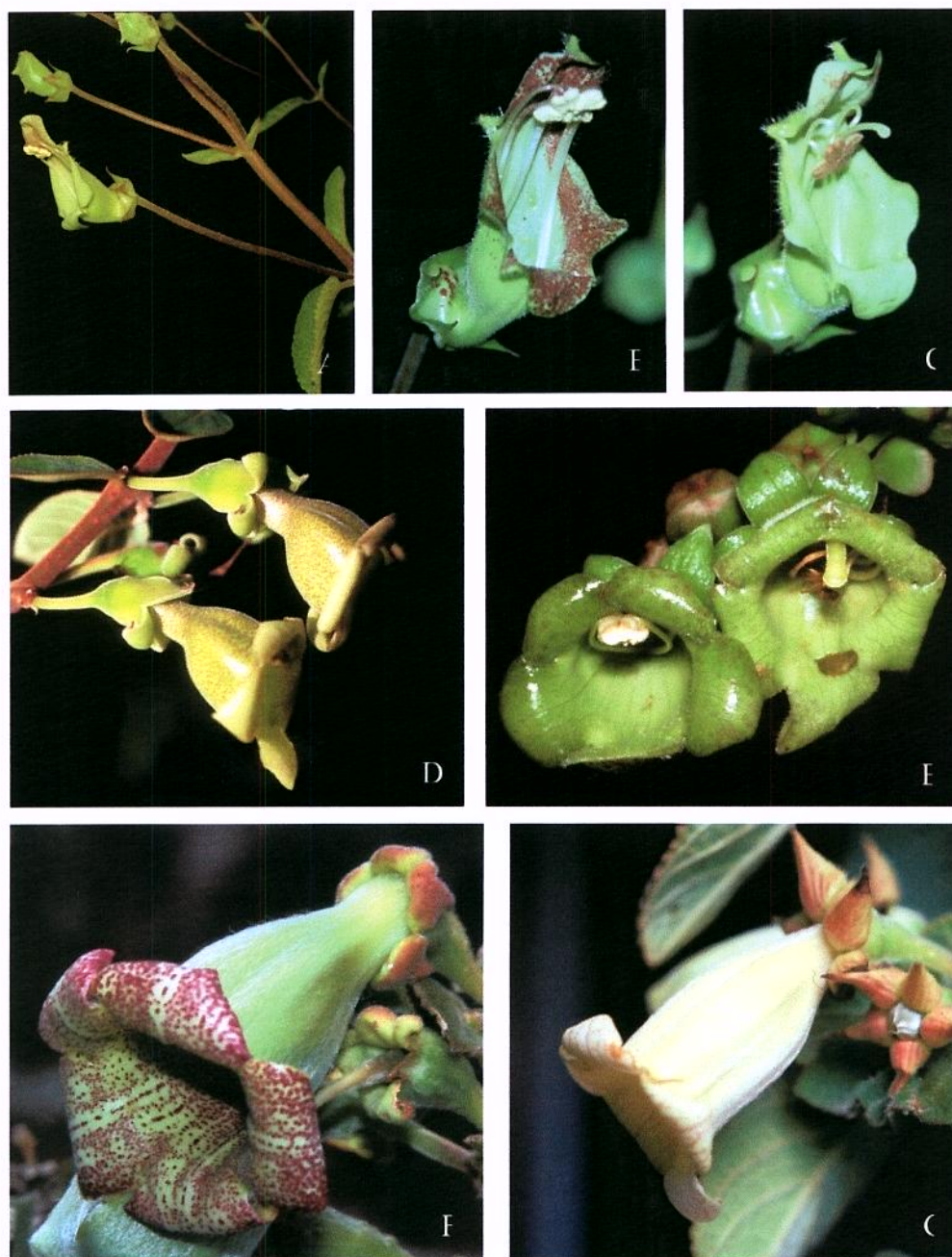


FIG. 1. Inflorescence of *Sinningia brasiliensis* (A), note the long stalk of the flower. *S. brasiliensis* flowers of different individuals in the first day of anthesis (male phase) (B), showing the characteristic anther disposition, and female phase with empty anthers and the extended style (C). Side view of *Paliavana prasinata* inflorescence (D) and frontal view of flowers, male phase (left) and female phase (right) (E); Gullet-type flower (F) and tubular flower of *P. sericiflora* (G), note the reddish calyx and different coloration.

Nectar features

Nectar secretion is continuous in the flowers of the studied species, starting at pre-anthesis and stopping after corolla fall. The average nectar volume accumulated during 24 hours is high and similar in these species (Table 1), and also to the data reported by Perret *et al.* (2001) for *P. prasinata* and *S. brasiliensis* (mean = 88.9 μ l). Large quantity of nectar, as occurs in the studied species, is a common attribute for bat flowers (Faegri and Pijl, 1980). Nectar concentration differs significantly among species (ANOVA Test, $df = 2$, $F = 40.5$, $p = 0.000$), and sugar amount differs significantly between *P. sericiflora* and the two other species (ANOVA Test, $df = 2$, $F = 6.7$, $p = 0.003$). The mean nectar concentration in *S. brasiliensis* and *P. prasinata* is lower than in *P. sericiflora* (Table 1), but, these values are similar to the range found in 33 bat-pollinated flowers of the Neotropics 5 – 29% (often 15 – 17 %) according to Helversen (1993). However, the mean nectar concentration of *P. sericiflora* is also similar to the values of ornithophilous Gesneriaceae species e.g. *Columnea glabra* Oerst., about 25-30 % (Corbet and Willmer, 1981) and *Sinningia* species range 22 – 25 % (SanMartin-Gajardo and Sazima, pers. obs.).

TABLE 1. Nectar production measured from flowers enclosed during the first 24 hours of anthesis.

Species	N	Nectar volume (μ l)	Nectar concentration (%w/w)	Sugar amount (mg)
<i>Sinningia brasiliensis</i>	12	85 \pm 42	17.5 \pm 2.6	15 \pm 7.1
<i>Paliavana prasinata</i>	22	82 \pm 38	14.3 \pm 3.6	12.1 \pm 6.6
<i>P. sericiflora</i>	15	87 \pm 42	23.2 \pm 2.0	21.8 \pm 10.1

The variation in nectar volume within each time interval throughout the flower lifetime was significantly different in *S. brasiliensis* (Kruskal-Wallis ANOVA test, $H_{(2, n=62)} = 8.5$; $p = 0.01$), as well as in *P. prasinata* (Kruskal-Wallis ANOVA test, $H_{(3, n=56)} = 18.7$; $p = 0.0003$). Both species increased the nectar volume significantly at mid-night (Dunn test; $p < 0.05$) (Figs. 2A and 2B). This pattern of nectar production of *S. brasiliensis* and *P. prasinata* is similar to other bat-pollinated species (Pettersen and Knudsen 2001; Slauson, 2000; Buzato *et al.*, 1994; Sazima *et al.*, 1994). In contrast to the former species the nectar production in *P. sericiflora* is continuous during the flower's life, with no significant differences between periods of the day or night (Fig. 2C). High nectar volume produced by *P. sericiflora* fits well on the chiropterophilous syndrome, but continuous production between day and night added with sugar concentration higher may be also a feature of an intermediate situation.

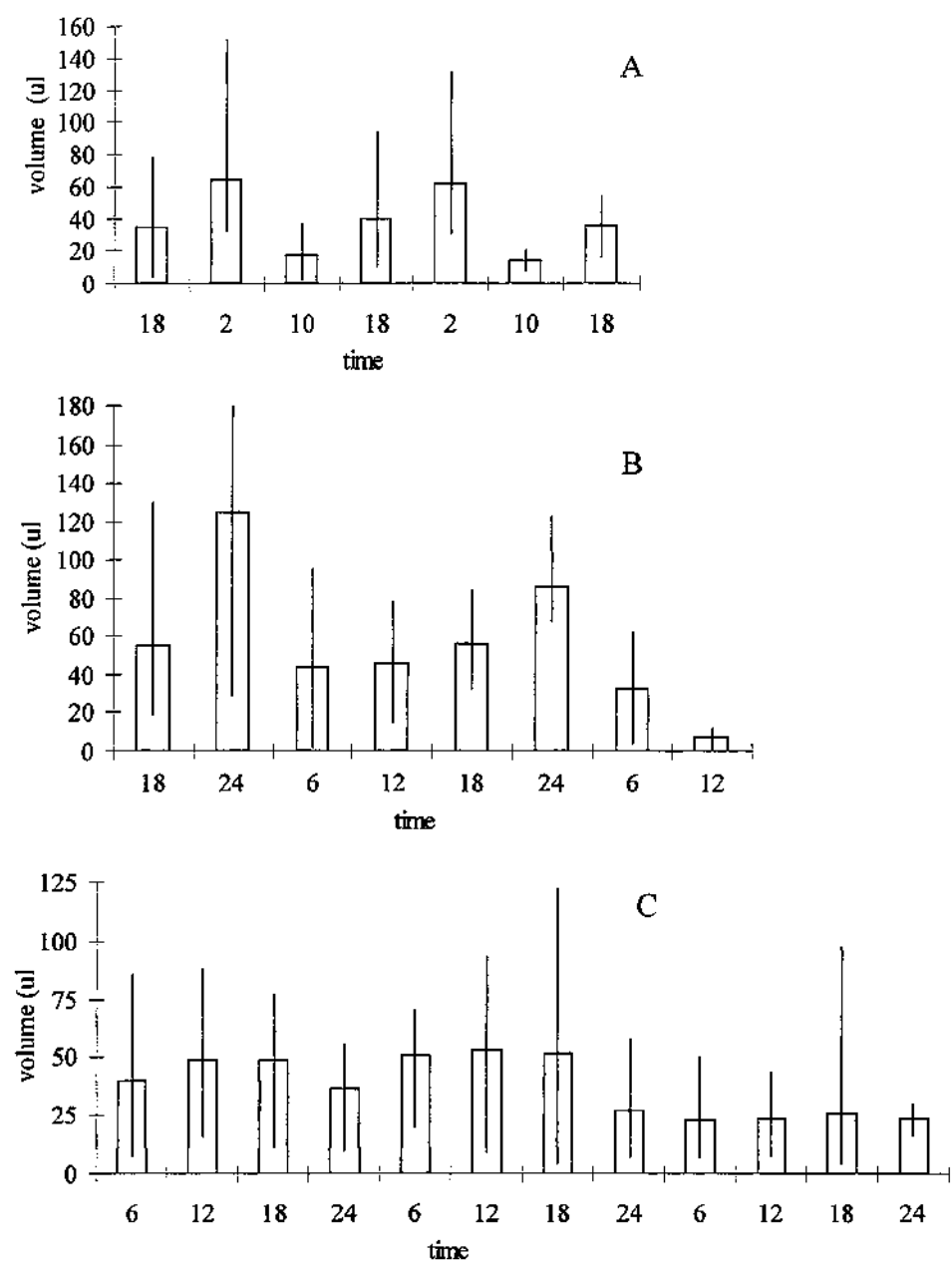


FIG 2. Nectar volume produced by *S. brasiliensis* (A), *Paliavana prasinata* (B) and *P. sericiflora* (C) throughout anthesis. The bars represents the average, the top and down of line indicate maximum and minimum range.

Floral Scents

The flowers of *S. brasiliensis* and *P. prasinata* exhale a strong fruity-sharp and very unpleasant smell. Scent production starts at sunset (ca. 1800 h), decreases progressively during the night, and ceases early in the morning. In contrast, flowers of *P. sericiflora* have a fruit fermenting odour which is almost imperceptible throughout the anthesis. Vogel (1969) has argued that attraction for bats is more linked to the heavy scent production of the petal surfaces than to the dull colours of the flowers. Bats are able to detect and localize a source of food guided only by the scent (Helvesen *et al.* 2000). The scent intensity in *P. sericiflora* does not seem to be strong enough to attract bats to their flowers.

We detected mostly a monoterpene compound: 2-cyclohexe-1-one, 3-methyl, 6-(1'-hydroxy)-methyl (Fig. 3), which is close to Limonene. This chemical compound was equal in *S. brasiliensis* and both *Paliavana* species. This substance was found in other chiropterophilous species, such as *Passiflora mucronata* (Varassin *et al.*, 2001), *Parmentiera aculeata*, *Passiflora alata*, and *Hippeastrum calyptratum* (Bestmann *et al.*, 1997). As such other plant features, scents and chemical composition may also reflect phylogenetic affinities of species, as well as, evolutionary history (Nogueira *et al.*, 2001).

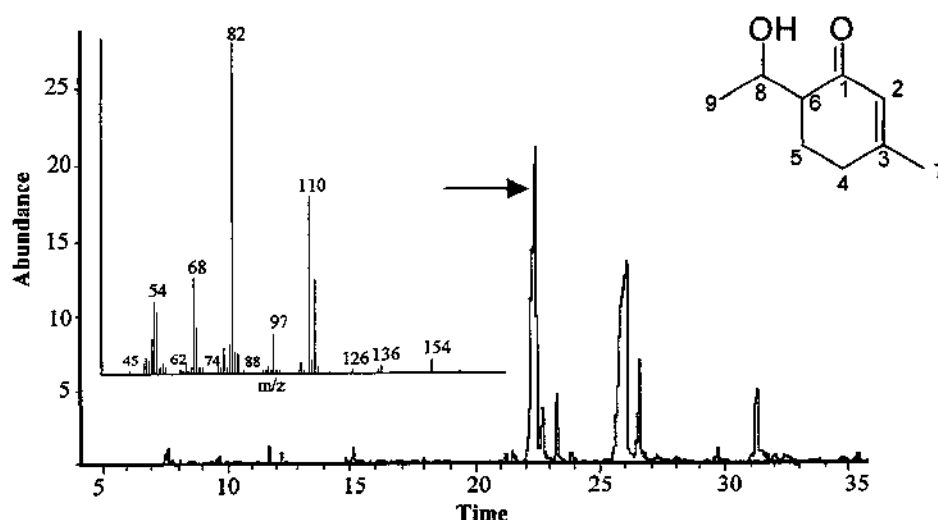
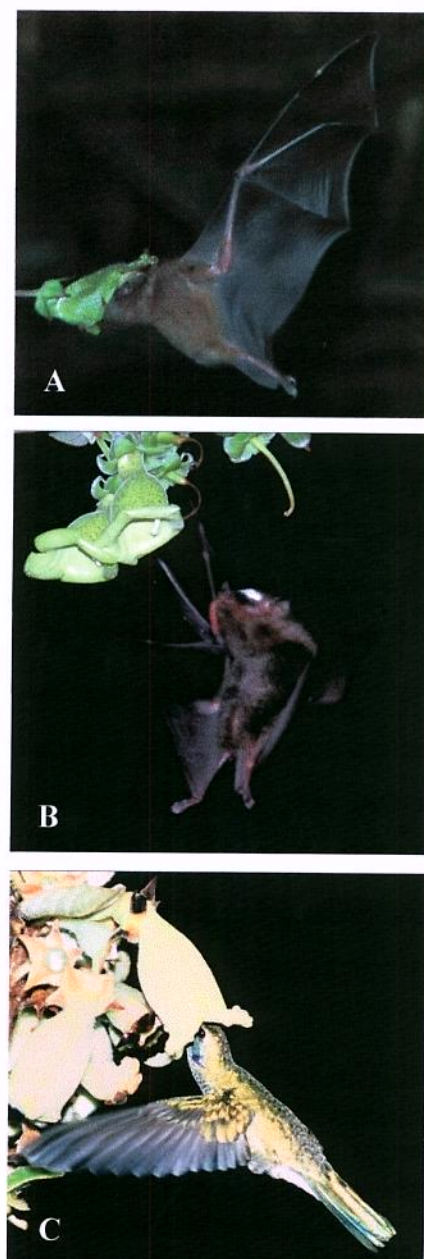


FIG 3. Total ion chromatogram from the scent analysis of *Sinningia brasiliensis*. Inset is a graph of an ion trap electron ionization mass spectrum of the major peak, identified as 2 cyclohexe-1one, 3 methyl, 6 (1'hydrxy) methyl.

Visitors

Anoura caudifer (E. Geoffroy) was the only bat visitor recorded on *S. brasiliensis* flowers (Fig. 4 A). This bat species and also *Glossophaga soricina* (Pallas) were recorded visiting the flowers of *P. prasinata*. These phyllostomid long-tongued bats are the major pollinators of bat-pollinated flower assemblages in the Atlantic rain forest (Sazima *et al.*, 1999). The bats arrived at the flowering plants of *S. brasiliensis* and *P. prasinata* at dusk (1830 h), and visits ceased at 0300 in *S. brasiliensis*, and at dawn (0530 h) in *P. prasinata*. Before the first visit to a given flower, the bats made a pass close to the flower, probably assessing its condition (see Sazima *et al.*, 1995; Machado *et al.*, 1998). The visits in both species occurred at regular intervals of 1 - 2 h in *S. brasiliensis* and 10 - 20 min in *P. prasinata*. However, the intervals of visits decreased by half in the period from 2100 to 0100 h. The increase in visits at this time coincides with the increase of nectar production. This fact supports the idea of Zimmerman (1988), that the rate of nectar production will have significant effects on the behavior of pollinators. Considering the optimal foraging theory of Pyke *et al.* (1977), it is possible that the nectar available to pollinators at a certain period, may influence visit frequency to the plants (see Rathcke, 1991). During their short hovering visits, the bats touched the flower's reproductive organs mostly with the forehead (Figs 4 A e 4B) and occasionally with the chin.

FIG 4. *Glossophaga soricina* on flower of *Sinningia brasiliensis* (A), its snout deep into the corolla; *Paliavana prasinata* visited by *Anoura caudifer* (B), note the whitish pollen adhered on bat's forehead; the hummingbird *Colibri serrirostris* visiting *Paliavana sericiflora* flower (C).



The visits occurred at regular intervals, suggesting a traplining behavior, common in these bats (Heithaus, 1982; Lemke, 1984). They also established a regular route and visited flowers of different individuals, this behavior favours cross-pollination and gene flow between adjacent populations (see Webb and Bawa, 1983).

Three species of hummingbirds were recorded on the flowers of *P. sericiflora*: the White-vented Violetear, *Colibri serrirostris* (Vieillot), the Stripe-breasted Starthroat, *Helimaster squamosus* (Temminck) and the Hyacinth Visorbearer, *Augastes scutatus* (Grantsau). The hummingbirds *C. serrirostris* and *A. scutatus* are common in the area and have been recorded visiting different flower species in the campos rupestres in Minas Gerais (Sazima, 1977; Sazima and Sazima, 1990; Vasconcelos and Lombardi, 2001). But, as far as we are aware, this is the first record of *Helimaster squamosus* in this area. *C. serrirostris* was the most frequent visitor (1.6 visit/hour) to *P. sericiflora* (Fig. 4C) and occurred throughout the day, whereas *H. squamosus* was a sporadic visitor (0.12 visit/hour), occurring at the beginning and the end of the day. During their hovering visits, the birds touched the flower's reproductive organs with the upper forehead. The visits of *C. serrirostris* occurred at intervals of 20-30 minutes, and sometimes 70 min, characterizing a traplining behaviour (Janzen, 1971). This behaviour was also reported for *C. serrirostris* when visiting *P. sericiflora* (Vasconcelos and Lombardi, 2001). *A. scutatus* visited the flowers of *P. sericiflora* by taking nectar through small holes in the corolla base, again as reported by Vasconcelos and Lombardi (2001).

CONCLUDING REMARKS

The records on floral biology and pollination in *P. prasinata* and *S. brasiliensis* confirm the bat syndrome proposed by Vogel (1969) for these species. In spite of floral traits (greenish, widely open and gullet-like flowes) of these species, vegetative habit like perenial habits and tuberous with annual steam (Vogel 1969), added to the results of molecular systematics (Perret *et al.* 2003) suggested that the bat syndrome in Sinningieae originated independently in *Sinningia brasiliensis* and in the *Paliavana* species.

Although *P. sericiflora* flowers have intermediate characteristics between bird and bat syndromes this species is pollinated only by hummingbirds. Intermediate pollination systems seem to be a relatively frequent event during the evolution of flowering plants, e.g. *Siphocampylus sulfureus* (Lobeliaceae) (Sazima *et al.* 1994), *Abutilon* species (Malvaceae) (Buzato *et al.* 1994), *Silene alba* (Caryophyllaceae) (Young 2002) and *Isertia laevis* (Rubiaceae) (Wolff *et al.* 2003),

however these species are pollinated by both nocturnal and diurnal visitors. The features, yellowish with violet brown dots, wide mouthed, gullet-type flowers of *P. sericiflora* and large amount of nectar fit well in the chiropterophilous syndrome, but important characters are lacking, such as crepuscular anthesis and strong unpleasant scent. The last feature seems to be decisive to attract bats (Tschapka and Dressler 2002) a suggestion supported by the studies of Sazima et al. (1994) and Buzato et al. (1994), and might explain the bats absence on flowers of *P. sericiflora*.

Paliavana werdermannii Mansf. is another supposed bat pollinated species in Sinningieae, and it is the sister-species of *P. sericiflora* in the molecular phylogeny proposed by Perret *et al.* (2003). Morphological floral features of *P. werdermannii* recorded from dried material indicate high similarity with *P. sericiflora*. It is probable that field records about pollination of the former species should allow inferences about origins and evolutionary directions of the pollination systems of these species.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank P. Gibbs and L. Freitas for comments on the manuscript; J.R. Trigo for chemical analysis of the scent; H.Q.B. Fernandes and Pe. C. Amore for facilities at the MBML, the EBSL and RPPN Santuário do Caraça, respectively. Essential financial support was provided by FAPESP and CNPq.

LITERATURE CITED

- Bestmann H. J., Winkler L., Helversen von O.** 1997. Headspace analysis of volatile flower scent constituents of bat-pollinated plants. *Phytochemistry* **46**:1169-1172.
- Baker H. G., Baker I., Hodges S. A.** 1998. Sugar composition of nectars and fruits consumed by birds and bats in the tropics and subtropics. *Biotropica* **30**:559-586,
- Bolten A. B., Feinsinger P., Baker H., Baker R.** 1979. On the calculation of sugar concentration in flower nectar. *Oecologia* **41**: 301-304.
- Buzato S., Sazima M., Sazima I.** 1994. Pollination of three species of *Abutilon* (Malvaceae) intermediate between bat and hummingbird flowers syndromes. *Flora* **189**: 327-334.
- Chautems A., Weber A.** 1999. Shoot and inflorescence architecture of the neotropical genus *Sinningia* (Gesneriaceae). In *The evolution of plant Architecture* (Kurmman, M. H. and Hemsley, A. R., eds.), London Kew: Royal Botanic Gardens, pp. 305 - 332.

- Corbet S. A., Willmer P. G.** 1981. The nectar of *Justicia* and *Columnea*: Composition and concentration in a humid tropical climate. *Oecologia* **51**: 412-418.
- Dobat K., Peikert-Holle T.** 1985. Blüten und Fledermäuse, Bestäubung durch Fledermäuse und Flughunde (Chiroptophilie). Frankfurt: Waldemar Kramer.
- Faegri K., van der Pijl L.** 1980. The principles of pollination ecology. Oxford: Pergamon Press.
- Giulietti A. M., Pirani J. R.** 1988. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço range, Minas Gerais, Bahia, Brazil. In: Proceeding of a workshop on Neotropical distribution patterns. Eds. Hever W.R., Vanzolini P.F. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p. 39-69.
- Grant K. A., Grant V.** 1968. Hummingbird and their flowers. Columbia University Press, New York.
- Gribel R., Gibbs P. E., Queiróz A. L.** 1999. Flowering phenology and pollination biology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in central Amazonia. *J. Trop. Ecol.* **15**: 247-263.
- Heithaus E. R.** 1982. Coevolution between bats and plants. Pp.287-325. In: Kunz, T.H. (ed.) Ecology of bats. Plenum Press, New York.
- Helversen von O.** 1993. Adaptations of flowers to the pollination by Glossophagine bats. In: Barthlott W., Naumann C.M., Schmidt-Loske K., Schuchmann K.L. (eds.). Plant-Animal interactions in Tropical Environments. Bonn: Museum Alexander Koenig, pp. 41-59.
- Helversen von O., Winkler L., Bestmann H. J.** 2000. Sulphur-containing "perfumes" attracts flower-visiting bat. *J. Comp Physiol A.* **186**:143-153.
- Janzen D.H.** 1971. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science* **171**:203-205.
- Kornerup A., Wanscher J. H.** 1963. Taschenlexikon der Farben. Musterschmidt, Zürich.
- Lemke T. O.** 1984. Foraging ecology of the long nosed bat, *Glossophaga soricina*, with respect to resource availability. *Ecology* **65**:538-548.
- Machado I. C. S., Sazima I., Sazima M.** 1998. Bat pollination of the terrestrial herb *Irlbachia alata* (Gentianaceae) in northeastern Brazil. *Pl. Syst. Evol.* **209**:231-237.
- Newstrom L. E., Frankie G. W., Baker H. G.** 1994. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* **26**: 141-159.
- Nimer E.** 1972. Climatologia da região sudeste do Brasil. *Rev. Brasil. Geogr.* **34**: 3-48.

- Nogueira P. C. L., Bittrich V., Shepherd G. J. , Lopes A. V., Marsaioli A.J. 2001. The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae). *Phytochemistry* **56**:443-452.
- Oliveira-Filho A. T., Fontes M. A. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in South-eastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* **32**: 793-810.
- Perret M., Chautems A., Spichiger R., Peixoto M., Savolainen V. 2001. Nectar sugar composition in relation to pollination syndromes in Sinningieae (Gesneriaceae). *Annals of Botany* **87**: 267-273.
- Perret M., Chautems A., Spichiger R., Kite G., Savolainen V. 2003. Systematics and evolution of tribe Sinningieae (Gesneriaceae): evidences from phylogenetic analyses of six plastid DNA regions and nuclear NCPGS. *American Journal of Botany* **90**: 445 - 460.
- Pettersson S., Knudsen J. T. 2001. Floral scent , nectar production in *Parkia biglobosa* Jacq. (Leguminosae: Mimosoideae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **135**: 97-106.
- Pyke G. H., Pulliam H. R., Charnov E. L. 1977. Optimal Foraging: a selective review of the theory and tests. *The Quarterly Review of Biology* **52**: 137-154.
- Radford A. E., Dickinson W. C., Massey J. R., Bell C. R. 1974. *Vascular plant systematics*. New York: Harper and Tow Publishing, 891 p.
- Rathcke B. J. 1991. Nectar distribution, pollinator behavior and plants reproductive success. In: Hunter M.D., Ohgushi T. , Prince P.W. (eds). *Effect of resource distribution on animal-plants interactions*. San Diego, Academic Press, 113-138.
- Slauson L. A. 2000. Pollination biology of two chiropterophilous *Agaves* in Arizona. *American Journal of Botany* **87**: 825-836.
- SanMartin-Gajardo I., Freitas L. 1999. Hummingbird pollination in *Besleria longimucronata* Hoehne (Gesneriaceae) in southeastern Brazil. *Biociências* **7**: 13-24.
- Sazima I., Vogel S. , Sazima M. 1989. Bat pollination of *Encholirium glaziovii*, a terrestrial bromeliad. *Pl. Syst. Evol.* **168**: 167-179.
- Sazima M. , Sazima I. 1990. Hummingbird pollination in two species of *Vellozia* (Liliiflorae: Velloziaceae) in southeastern Brazil. *Botanica Acta* **103**: 83-86.
- Sazima M. 1977. Hummingbird pollination of *Barbacenia flava* (Velloziaceae) in the Serra do Cipó, Minas Gerais, Brazil. *Flora* **166**: S. 239-247.
- Sazima M., Buzato S., Sazima I. 1995. Polinização de *Vriesea* por morcegos no sudeste brasileiro. *Bromelia*: **2**: 29-37.

- Sazima M., Buzato S., Sazima I.** 1999. Bat-pollinated flowers assemblages and bat visitors at two Atlantic forest sites in Brazil. *Annals of Botany* **83**: 705-712.
- Sazima M., Sazima I. , Buzato S.** 1994. Nectar by day and night: *Siphocampylus sulfureus* (Lobeliaceae) pollinated by hummingbirds , bats. *Pl. Syst. Evol.* **191**: 237-249.
- Smith JF, Wolfram JC, Brown CL, Carroll CL, Denton DS.** 1997. Tribal relationships in the Gesneriaceae: evidence from DNA sequences of the chloroplast gene *ndhF*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **84**: 50-66.
- Steiner K.E.** 1985. The role of nectar and oil in the pollination of *Drymonia serrulata* (Gesneriaceae) by *Epicharis* bees (Anthophoridae) in Panama. *Biotropica* **17**: 217-229.
- Thomaz L.D. , Monteiro R.** 1997. Composição florística da Mata Atlântica de encosta da Estação Biológica de Santa Lúcia, município de Santa Tereza-ES. *Bol. Mus. Biol. Mello Leitão (N. Sér.)* **7**: 3-48.
- Varassin I.G., Trigo J.R., Sazima M.** 2001. The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south-eastern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* **136**: 139-152.
- Vasconcelos M.F. , Lombardi J.A** 2001. Hummingbird , their flowers in the campos rupestres of southern Espinhaço Range, Brazil. *Melospittacus* **4**: 3-30.
- Vogel S.** 1969. Chiropterophilie in der neotropischen Flora. II. *Flora* **158**: 185-222.
- Webb C.J. , Bawa K.S.** 1983. Pollen dispersal by hummingbirds and butterflies: a comparative study of two lowland tropical plants. *Evolution* **37**: 1258-1270.
- Whitten W.M., Young A.M. , Stern D.L.,** 1993. Nonfloral sources of chemicals that attract male Euglossine bees (Apidae: Euglossini). *Journal of Chemical Ecology* **19**: 3017-3027.
- Wiehler H.** 1983. A synopsis of the Neotropical Gesneriaceae. *Selbyana* **6**: 1-219.
- Wolf, L. L., Stiles F.G., Hainsworth F.R.** 1976. Ecological organization of a highland tropical hummingbird community. *Journal of the Animal Ecology* **32**: 349 – 379.
- Wolff D, Braun M, Liedes S.** 2003. Nocturnal versus diurnal pollination success in *Isertia laevis* (Rubiaceae): a sphingophilous plant visited by hummingbirds. *Plant Biology* **5**:71-78.
- Zeisler M.** 1938. Über die Abgrenzung der eigentlichen Narbenfläche mit Hilfe von Reaktionen. *Beihefte zum Botanisches Zentralblatt* **58**: 308-318.
- Zimmerman M.** 1988. Nectar production, flowering phenology and strategies for pollination. In: J.D. Lovett. and Lovett L.D (eds.). *Plant Reproductive Ecology: patterns and strategies.* p.157-178. Oxford University Press, New York.

CAPÍTULO IV

CARACTERES FLORAIS ASSOCIADOS AOS POLINIZADORES EM ESPÉCIES DA TRIBO SINNINGIEAE: UMA ANÁLISE COMPARATIVA

INTRODUÇÃO

A morfologia floral é um dos aspectos mais importantes na interação planta-polinizador (Sakai *et al.* 1999), determinando a atração do polinizador, a acessibilidade ao recurso, a eficiência da deposição de pólen no corpo do polinizador, bem como, a aquisição pelo estigma do pólen trazido pelos vetores (e.g. Rebelo & Siegfried 1985; Armbruster *et al.* 1994; Hapeman & Inoue 1997). A diversidade de formas, cores e odores nas flores reflete altas taxas de mudanças evolutivas, as quais, afetam principalmente a atração de possíveis vetores de pólen (Stebbins 1970; Hapeman & Inoue 1997; Johnson *et al.* 1998). Neste sentido, o número de vezes que um determinado caráter evoluiu em certo grupo e qual caminho evolutivo foi tomado têm sido questões freqüentes entre evolucionistas e sistematas.

Em estudo pioneiro sobre a radiação adaptativa das flores na família Polemoniaceae, Grant & Grant (1965) concluem que a radiação de formas florais é resultado de saltos sucessivos de um sistema de polinização para outro dentre as diversas espécies da família. Nas últimas décadas, o mapeamento das características ecológicas sobre uma hipótese filogenética tem apresentado bons resultados ao estudar padrões e processos de evolução nas flores de um determinado grupo de plantas (Armbruster 1992, 1993; McDade 1992; Luckow & Hopkins 1995; Bruneau 1997; Johnson *et al.* 1998; Harrison *et al.* 1999; Armbruster *et al.* 2002). No entanto, existem limitações no uso da filogenia para compreender processos evolutivos relacionados, principalmente, com a confiabilidade das hipótese filogenéticas. Armbruster (1992) aponta três problemas potenciais na interpretação filogenética de dados ecológicos. O primeiro é a omissão de táxons ou de dados para um ou mais táxons, que dificulta a interpretação final dos resultados, bem como, a inclusão de novos dados poderia alterar as conclusões. Segundo, pequenas mudanças na topologia do cladograma podem modificar drasticamente as conclusões evolutivas, então, um cladograma deve ser consideravelmente confiável antes de ser utilizado para interpretar a evolução de características ecológicas. Por último, em um cladograma construído com dados que não são independentes dos dados ecológicos que estão sendo analisados, as conclusões podem refletir uma seqüência circular dos resultados. Por exemplo, realizar uma análise das mudanças nos sistemas de polinização

utilizando uma análise cladística com base em caracteres florais, os quais são fortemente ligados à ecologia da polinização.

Por outro lado, Delaporte (1993) discute que “circularidade” não é um problema, pois raramente a reconstrução filogenética é feita de forma a distorcer os resultados sobre a evolução do caractere que está sendo testado. Esta idéia é confirmada no estudo de Bruneau (1997), sobre evolução dos sistemas de polinização em *Erythrina*, no qual são examinadas homologias e correlações associadas à polinização por aves. Bruneau (1997) sugere que quando caracteres associados às síndromes são individualizados podem proporcionar hipóteses de homologia para avaliar relações filogenéticas que são independentes da biologia da polinização. Entretanto, a autora enfatiza que devido as síndromes serem essencialmente correlatas com caracteres florais, sua homologia pode ser particularmente difícil de ser detectada. Assim sendo, um cuidado especial deve ser tomado para distinguir homologia de convergência no conjunto de caracteres analisados.

Nos últimos anos, o desenvolvimento dos métodos de análises cladísticas, somado à disponibilidade de informações filogenéticas com base em dados moleculares, tornou possível a construção de hipóteses filogenéticas mais confiáveis e independentes das características morfológicas ou ecológicas (Diniz-Filho 2000). Deste modo, tem sido possível gerar hipóteses evolutivas que permitem avaliação mais apurada das causas da diversidade de características florais em um determinado grupo de espécies. Em adição, o avanço nos métodos estatísticos comparativos que combinam a variação de caracteres com informações sobre as relações filogenéticas entre as espécies, tem produzido grande quantidade de informações sobre os padrões e processos de evolução (ver Harvey & Pagel 1991; Diniz-Filho 2000). O principal problema metodológico para comparar estatisticamente espécies aparentadas é o fato de que estas espécies compartilham ancestrais em comum, ou seja, a existência de um padrão filogenético implica na ausência de independência na variação de um determinado caráter (Felsenstein 1985). Os métodos filogenéticos comparativos, os quais incorporam informações filogenéticas aos testes estatísticos convencionais, têm sido amplamente utilizados na biologia evolutiva (Miles e Dunham 1993; Diniz-Filho 2000). Este tipo de análise tem sido comumente utilizada para interpretar adaptações de caracteres florais aos grupos de polinizadores (e.g. Armbruster 1996, 2002), bem como, identificar a associação de caracteres morfológicos e ecológicos com a evolução do sistema reprodutivo (Barrett *et al.* 1996; Larson & Barrett 2000; Armbruster *et al.* 2002).

A tribo Sinningieae, composta pelos gêneros *Sinningia* Nees (ca. 65 espécies), *Vanhouttea* Lemaire (oito espécies) e *Paliavana* Vandelli (seis espécies), foi recentemente redefinida com base em dados moleculares por Smith *et al.* (1997) e Zimmer *et al.* (2002). A diversidade ampla de

espécies que compõem a tribo pode ser evidenciada nos seus hábitos, que variam desde espécies herbáceas com tubérculo perene na maioria das *Sinningia*, até arbustos lenhosos em *Vanhouttea* e *Paliavana* (Chautems & Weber 1999) e, principalmente, na variedade de tamanho, formas e cores das suas flores (ver Perret *et al.* 2001). A partir da morfologia floral foram inferidas as síndromes de polinização para todas as espécies da tribo por Perret *et al.* (2001), classificando 66% das espécies como ornitófilas e 20% melitófilas, além de três espécies quiropterófilas, duas psicófilas e uma esfingófila. Entretanto, observações de campo que confirmem os polinizadores efetivos são restritas a poucas espécies polinizadas por beija-flores (Snow & Teixeira 1982; Sazima *et al.* 1996; Chautems *et al.* 2000; Vasconcelos & Lombardi 2001; Freitas 2002).

A recente publicação da filogenia com base em dados moleculares da tribo *Sinningieae* (Perret *et al.* 2003) resultou em uma hipótese filogenética independente em relação a caracteres morfológicos ou ecológicos. Esta hipótese proporcionou a oportunidade de avaliar associações entre morfologia floral e suas funções na polinização deste grupo. No presente estudo foram utilizados dados de morfologia da flor, de características do néctar (i.e. volume e concentração) e dos polinizadores de 23 espécies da tribo *Sinningieae* com o intuito de confirmar se os caracteres florais refletem corretamente os sistemas de polinização. Em adição, os dados sobre biologia da polinização foram analisados em um contexto filogenético com o objetivo específico de responder duas questões: i. quais são os caracteres florais associados com mudanças no tipo de polinizador?; ii. qual o caminho evolutivo dos sistemas de polinização no grupo das espécies estudadas?

MATERIAL E MÉTODOS

Caracteres florais

Um total de 23 espécies de *Sinningieae* foram estudadas, sendo 17 do gênero *Sinningia*, três de *Vanhouttea* e três de *Paliavana* (Tabela 1). A biologia floral e os polinizadores de 18 espécies foram registrados em populações naturais, durante o período de janeiro de 2000 a setembro de 2003 e em cinco espécies estes dados foram obtidos e/ou complementados a partir de literatura (Tabela 1). O número de flores utilizadas para medidas morfológicas e características do néctar consta da Tabela 1. As flores de diferentes indivíduos foram fixadas em FAA, acondicionadas em álcool e posteriormente medidas com paquímetro (0.05mm) no laboratório.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Tabela 1. Espécies da tribo Sinningieae utilizadas neste estudo e suas abreviações – Abr. Número de flores amostradas para morfologia - N Fl; número de flores utilizadas para características do néctar - N Nec; herbário onde as exsiccatas foram depositadas - H.

Espécies	Abr	N Fl	N Nec	Pico floração	Local de estudo	H
<i>P. gracilis</i> (Mart.) Chautems	Pgr	17	22	Mar-Mai	Carangola - MG	GFJP 4430
<i>P. prasinata</i> (Ker-Gawler) Benth.	Ppr	21	22	Abr-Ago	Sta. Tereza - ES	UEC 113858
<i>P. sericiflora</i> Benth.	Pse	15	15	Fev-Mai	São Tomé e Sta. Barbara- MG	UEC 111253
<i>S. "canastrensis"</i> sp. nov. ined. Chautems (em preparação)	Ssp	11	10	Dec-Jan	Canastra - MG	UEC 132337
<i>S. aggregata</i> (Ker-Gawler) Wiehler	Sag	10	8	Ago-Out	Jundiaí- SP	UEC 132334
<i>S. allagophylla</i> (Mart.) Wiehler ^{1,5}	Sal	31	4	Dez-Jan	São José do Barreiro ⁵ - SP	UEC
<i>S. brasiliensis</i> (Regel & Schmidt) Wiehler& Chautems	Sbr	21	12	Dez-Fev	Santa Tereza - ES	MBML 10183
<i>S. bulbosa</i> (Ker-Gawler) Wiehler	Sbu	20	16	Jul-Dez	Rio de Janeiro – RJ	UEC
<i>S. cochlearis</i> (Hook) Chautems	Sch	28	30	Jan-Fev	Teresópolis - RJ	UEC
<i>S. cooperi</i> (Paxton) Wiehler ^{4, 5}	Sco	10	5	Jan-Mar	São José do Barreiro ⁵ - SP	UEC
<i>S. douglasii</i> (Lindl.) Chautems	Sdo	20	20	Ago-Out	Jundiaí – SP	UEC 132332
<i>S. eumorpha</i> H.E. Moore	Seu	19	12	Dez-Jan	Itirapina – SP	RB 390086
<i>S. gigantifolia</i> Chautems	Sgi	25	27	Jan-Abr	Teresópolis - RJ	UEC 132327
<i>S. glazioviana</i> (Fritsch) Chautems	Sgl	10	-	Jul-Nov	São José do Barreiro - SP	UEC
<i>S. magnifica</i> (Otto & A. Dietr.) Wiehler ³	Sma	21	-	Jan-Mar	Ouro Preto – MG	MBML 13611
<i>S. nordestina</i> Chautems, Baracho& Siqueira Filho ²	Sno	10	-	Jun-Out	Maraial – PE	UFP 663
<i>S. rupicola</i> (Mart.) Wiehler ³	Sru	45	-	Dez-Jan	Belo Horizonte - MG	UEC
<i>S. schiffneri</i> Fritsch	Ssc	15	23	Out-Dez	Paranapiacaba - SP	UEC 132328
<i>S. tuberosa</i> (Mart.) H.E. Moore	Stu	15	32	Jan-Jun	Ibitipoca - MG	UEC 111254
<i>S. villosa</i> Lindl.	Svi	17	20	Dec-Fev	São João de Petrópolis - ES	MBML 11757
<i>V. brueggeri</i> Chautems	Vbr	10	30	Nov-Mai	Ibitipoca - MG	UEC 113861
<i>V. calcarata</i> Lem.	Vca	11	37	Fev-Abr	Teresópolis - RJ	UEC 111258
<i>V. hilariana</i> Chautems	Vhi	15	30	Nov-Mai	Ibitipoca - MG	UEC 113860

¹ Perret, M. dados não publicados; ² Chautems *et al.* 2000; ³ Vasconcelos & Lombardi 2001; ⁴ Buzato *et al.* 2000; ⁵ Freitas L. com. pess.

As características do néctar foram registradas no campo em flores de diferentes indivíduos previamente ensacadas por 24 horas. O volume de néctar e a concentração de açúcares foram medidos, respectivamente, com auxílio de micro-seringa e refratômetro manual Atago (0 – 90%). Exsicatas dessas espécies foram depositadas como material testemunho nos herbários da Universidade Estadual de Campinas (UEC), Museu de Biologia Mello Leitão (MBML) e da Universidade Estadual de Carangola (GFJP) (Tabela 1).

Para a análise morfológica dez caracteres florais foram selecionados e medidos (Apêndice 1): comprimento do tubo da corola (CTu); comprimento total da corola (CTc); constrição anterior à câmara de néctar (CACn); diâmetro maior da câmara de néctar (DMCn) (Figura 1A); diâmetro da corola com os lobos horizontais (laterais - DCLH); diâmetro frontal da corola com os lobos verticais (superiores e inferior - DCLV) (Figura 1B), quando o lobo superior mantinha o mesmo eixo do tubo, como em *S. brasiliensis* e *S. bulbosa*, foi considerado apenas o lobo inferior; diâmetro da abertura da corola horizontal (DAH); diâmetro da abertura da corola vertical (DAV) (Figura 1B); comprimento dos estames (CE - Figura 1C); comprimento do pistilo (CP - Figura 1D).

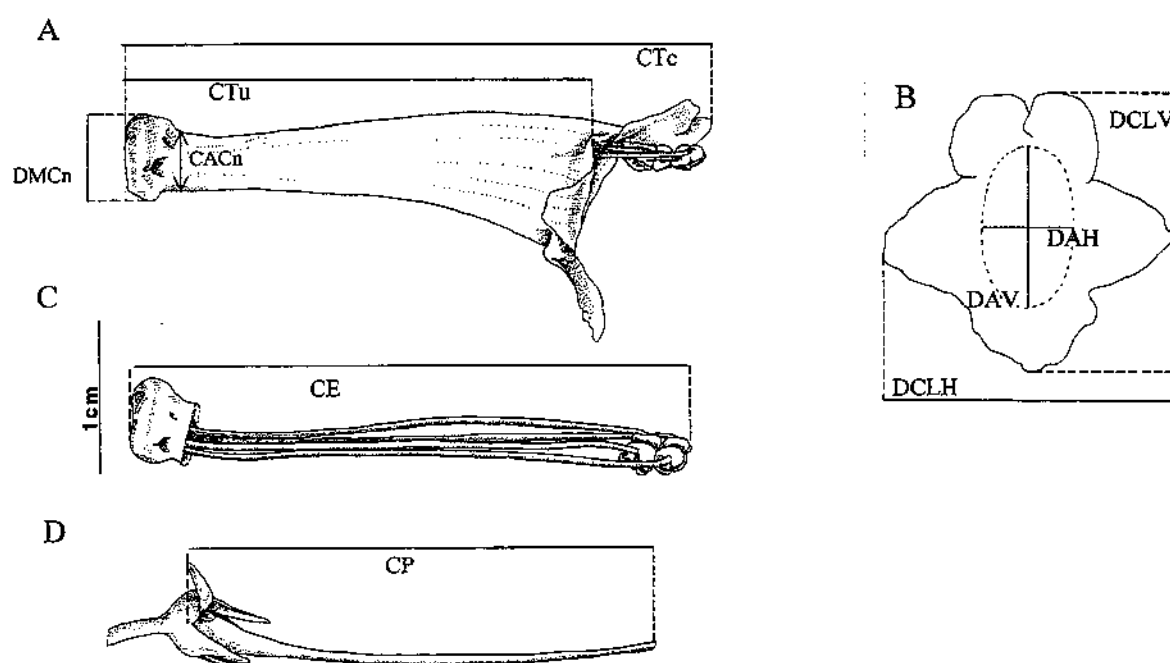


Figura 1. Esquemas de partes da flor de *Sinningia douglasii* mostrando os dez caracteres florais medidos. (A) Vista lateral da corola; (B) vista frontal da corola; (C) estames e parte da câmara de néctar; (D) pistilo com o cálice, note nectário na base do ovário (abreviações no texto).

Uma análise de componentes principais foi realizada para transformar o conjunto de dados sobre as características florais (variáveis correlacionadas) em um novo conjunto de variáveis não correlacionadas. A análise dos componentes principais indica componentes que são próximos às variáveis originais, porém dispostos em ordem hierárquica de importância (Monteiro e Reis 1999). O objetivo da análise foi verificar quais dos componentes principais podem explicar a maior parte da variação nos dados originais. Três espécies, das 23 amostradas, não entraram nesta análise devido a falta dos dados sobre néctar (*S. rupicola*, *S. magnifica* e *S. glazioviana*). O programa Statistica (StatSoft 2000) foi utilizado para calcular autovalores e coeficientes de variação (autovetores) nos três primeiros componentes principais obtidos desta análise.

Polinizadores

Os visitantes foram observados no campo à vista desarmada ou com auxílio de binóculos. Para determinar o principal polinizador foram registrados o comportamento e a frequência de visita. Os morcegos e a maioria dos beija-flores foram fotografados para posterior confirmação das identificações através das descrições e ilustrações de Silva (1985) e Grantsau (1989). As abelhas visitantes foram coletadas e enviadas para especialistas para identificação. Os espécimes coletados estão depositados no Museu de História Natural - Universidade Estadual de Campinas, Coleção de Entomologia Jesus de Santiago Moure - Universidade Federal do Paraná e Museu de Entomologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Medidas do tamanho do aparelho bucal dos principais polinizadores foram realizadas em espécimes de beija-flores e morcegos de coleções científicas (Museu Nacional - UFRJ) e nas abelhas coletadas durante este estudo. A medida do aparelho bucal variou conforme o grupo analisado: nas abelhas foi medida a distância entre o palpo maxilar e o ápice do premento (Silveira *et al.* 2000), nos beija-flores foi considerado o comprimento do cúlmen (Grantsau 1989) e nos morcegos a distância total entre a base e o ápice da língua (Gimenez *et al.* 1996) (Apêndice 3).

Filogenia da tribo

A filogenia da tribo Sinningieae foi estudada por Perret *et al.* (2003), com base em dados moleculares (seis regiões do DNA de cloroplasto - trnT-trnL, trnL-trnF, trnS-trnG, atpB-rbcL; dois introns - trnL e rpl16; um gene nuclear - ncpGS) de 76 espécies, utilizando o método de máximo de parcimônia.

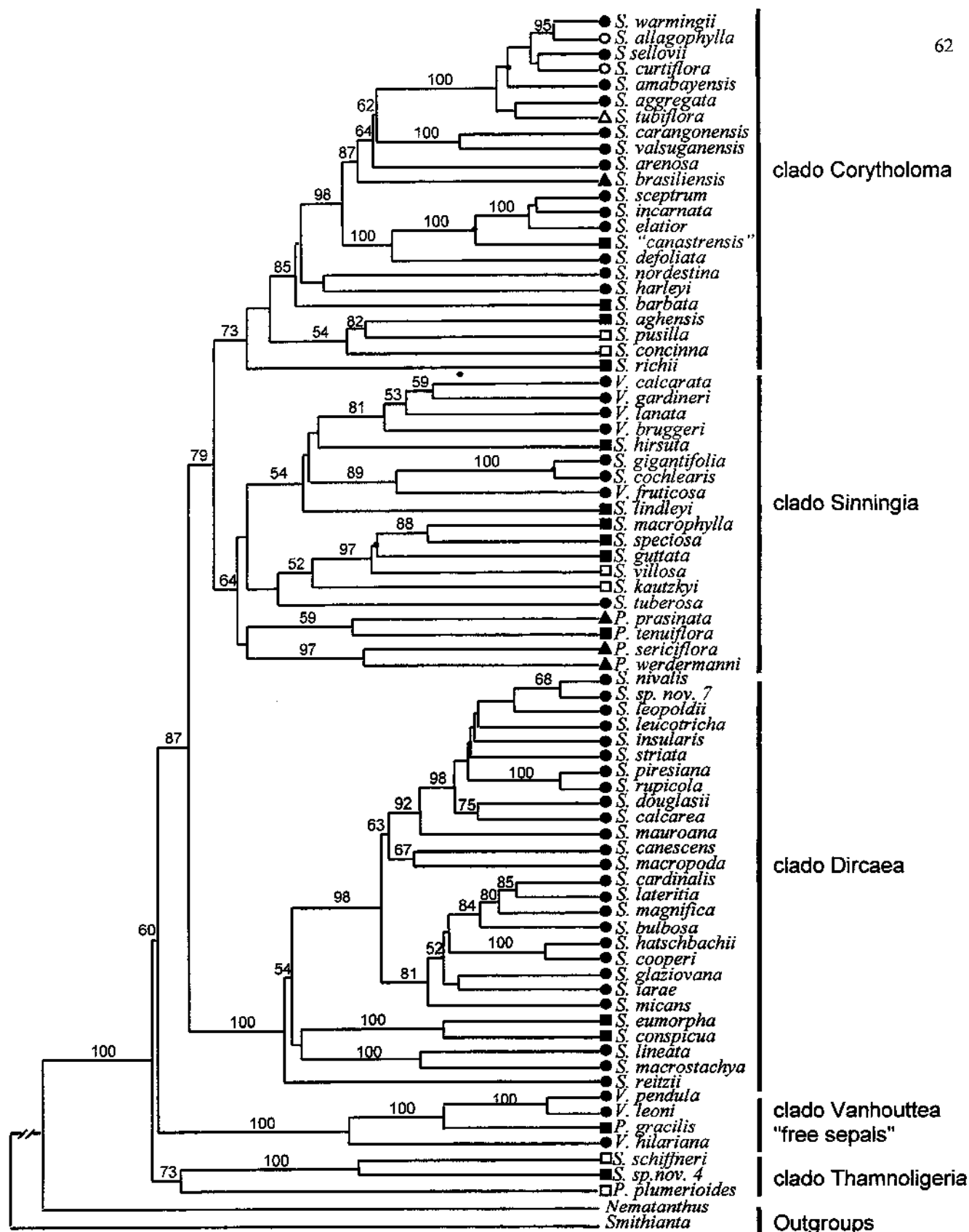


Figura 2. Árvore filogenética com base na combinação de quatro espaçadores (trnT-trnL, trnL-trnF, trnS-trnG, atpB-rbcL), dois introns (trnL e rpl16) e um gene nuclear (ncpGS) analisados através do método de máximo de verossimilhança (adaptado de Perret *et al.* em prep.). Os símbolos que antecedem os nomes das espécies se referem às síndromes de polinização: (●) beija-flores; (■ e □) abelhas; (▲) morcegos; (△) mariposa.

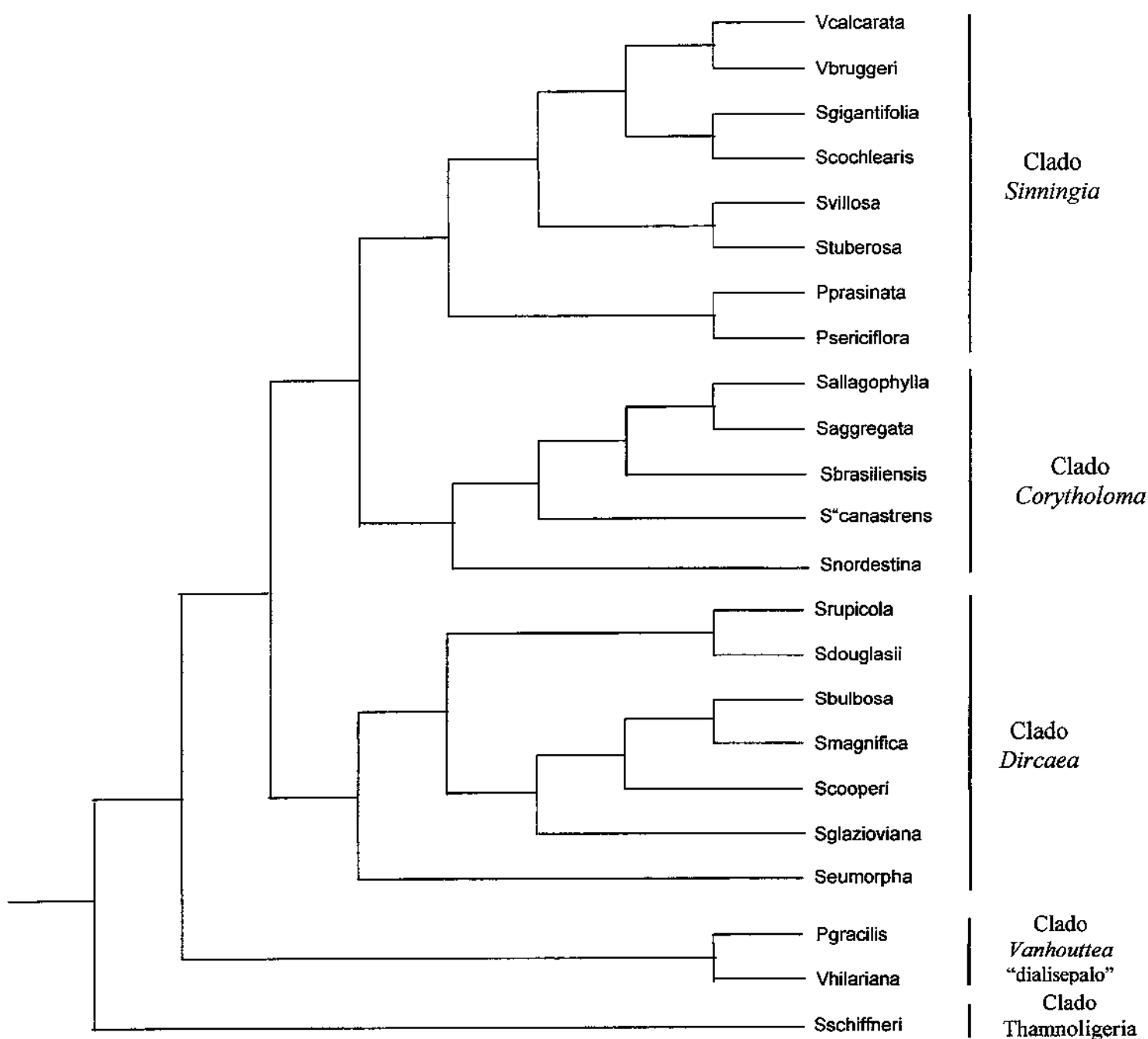


Figura 3. Relações filogenéticas das 23 espécies da tribo Sinningieae, com base na árvore filogenética obtida a partir de dados moleculares de 76 espécies analisados por Perret *et al.* (em prep. – Figura 2).

Estes autores utilizaram os mesmos dados moleculares para construir um novo cladograma para a tribo, com base na análise de máximo de verossimilhança (“maximum likelihood”), obtendo uma hipótese filogenética mais congruente com os caracteres morfológicos (Figura 2 - Perret *et al.*, em prep.). Esta árvore foi considerada a melhor hipótese filogenética da tribo Sinningieae obtida até o momento. Sendo assim, esta mesma árvore foi reduzida, mantendo apenas as 17 espécies de *Sinningia*, três de *Vanhouttea* e três de *Paliavana*, para as quais dados sobre a biologia floral e polinizadores foram obtidos (Figura 3). Esta árvore foi utilizada para o mapeamento dos caracteres florais e polinizadores das 23 espécies estudadas, utilizando McClade 4.06 (Maddison e Maddison 1992), bem como para a análise filogenética comparativa.

Análise filogenética comparativa

O método de contrastes filogenéticos independentes (Felsenstein 1985, Pagel 1992) foi utilizado para verificar as relações entre os caracteres florais, incluindo os escores dos componentes principais (variáveis contínuas), e o tipo de polinizadores (variáveis categóricas). Este método usa uma árvore filogenética para determinar comparações estatísticas para espécies irmãs e assume que diferenças de caracteres entre taxa (contrastos) tem evoluído desde sua origem comum, por isso, são independentes entre si (Larson & Barret 2000). Os contrastes foram calculados utilizando o programa CAIC (Purvis e Rambaut 1995). O programa calcula os contrastes (diferenças) entre os caracteres florais e os tipos de polinizadores (abelhas, beija-flores e morcegos), bem como, entre os caracteres florais e o tamanho do aparelho bucal dos principais polinizadores. Os valores dos contrastes são calculados em cada nó da filogenia onde existe mudança no tipo de polinizador. Ao comparar uma variável categórica com uma variável contínua (e.g. mudança para polinização por beija-flor vs. comprimento da corola), a hipótese nula é que não há correlação entre os caracteres florais nos nós da filogenia onde ocorre a mudança do tipo de polinizador. Então, a média dos contrastes da variável contínua deve ser diferente de zero (ver Purvis e Rambaut 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Grande variedade de tamanhos, formas e cores foi encontrada nas flores das 23 espécies estudadas. As flores tubulosas foram predominantes em 17 espécies, podendo ser curtas em *S.*

allagophylla, ou longas como em *S. glazioviana* (comprimento médio do tubo de 1,39 e 4,34 mm, respectivamente). Três espécies apresentaram flores funiliformes (*P. gracilis*, *S. eumorpha* e *S. “canastrensis”* sp. nov. ined.) e outras três espécies apresentaram flores do tipo goela, *S. brasiliensis*, *P. prasinata* e *P. sericiflora*, sendo que esta última também apresentou flores tubulosas em grande parte das flores amostradas. A coloração predominante foi o vermelho, mudando apenas de vermelho-escuro em *S. gigantifolia* para vermelho mais claro como em *V. calcarata*. O padrão das cores branco e amarelo não variou nas flores de *S. schiffneri* e *S. villosa*, bem como o da cor verde com pintas magentas em *S. brasiliensis* e *P. prasinata*. No entanto, variação nas cores das flores é comumente encontrado entre indivíduos e/ou populações de *P. sericiflora* (amarelo-verde), *S. “canastrensis”* (magenta-vinho) e *S. eumorpha* (branco-lilás).

Nas 23 espécies estudadas foram determinados três grupos de animais polinizadores. Os beija-flores foram responsáveis pela polinização de 17 espécies (Chautems *et al.* 2000; Vasconcelos & Lombardi 2001; Buzato *et al.* 2000; Freitas L. com. pess.; capítulo II deste estudo), vários grupos de abelhas foram os principais polinizadores de quatro espécies de *Sinningia* (capítulo I) e duas espécies de morcegos foram os polinizadores de *S. brasiliensis* e *P. prasinata* (capítulo III). Estes resultados permitiram, pela primeira vez, realizar uma análise comparativa das características florais e suas funções, aliadas às observações sobre os polinizadores na família Gesneriaceae.

A análise dos componentes principais das dez características florais mensuradas revelou grupos definidos, que correspondem aos tipos de polinizadores observados (Figuras 3A e B). Os autovalores dos três primeiros componentes (CP1, CP2 e CP3) explicam 47,2%, 21,7% e 11,4 % da variação das características florais, respectivamente. No primeiro componente (CP1), os coeficientes das variáveis foram positivos e maiores para: abertura vertical da corola, tamanho da câmara de néctar e comprimento total e do tubo da corola (Tabela 2).

O segundo componente (CP2) tem maior contribuição no comprimento de estilete e filete (Tabela 2) entretanto, CP2 reflete, principalmente, a variação na forma floral, uma vez que apresenta contribuição positiva em relação ao comprimento e negativa em relação ao diâmetro (Tabela 2). O terceiro componente (CP3) reflete as variações das características no néctar, apresentando os maiores coeficientes negativos e positivos para concentração e volume do néctar, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Coeficientes dos autovetores do primeiro, segundo e terceiro componentes principais (CP1, CP2 e CP3, respectivamente) resultados da análise multivariada de ordenação das doze características florais em 20 espécies da tribo Sinningieae. Cn = câmara de néctar. O asterisco indica os caracteres florais que apresentaram maior contribuição nos componentes principais.

Caracteres florais	CP1	CP2	CP3
Comprimento do tubo	0,32*	0,21	-0,23
Comprimento da corola	0,32*	0,34	-0,22
Diâmetro da corola horizontal	0,25	-0,39	-0,18
Diâmetro da corola vertical	0,28	-0,26	-0,26
Abertura horizontal	0,30	-0,33	-0,02
Abertura vertical	0,33*	-0,16	-0,03
Comprimento do estile	0,26	0,45*	0,09
Comprimento do filete	0,26	0,48*	0,06
Diâmetro da constricção anterior da Cn	0,33*	-0,24	0,17
Diâmetro maior da Cn	0,33*	-0,05	0,36
Volume de néctar	0,31	-0,02	0,41*
Concentração de açúcar	0,09	0,05	-0,68*

Três grupos de espécies com tamanhos, formas e características do néctar semelhantes, mas com diferentes tipos de polinizadores, são formados ao plotar os componentes principais (Figuras 3A e B). A projeção de CP1-CP2 reflete principalmente a relação entre o tamanho e a forma da corola. Os extremos da diversidade floral encontrados na tribo Sinningieae são representados pelas flores de corola curta e abertura estreita de *Sinningia schiffneri*, flores tubulares longas de *S. bulbosa* e curtas de *S. allagophylla*, bem como, funiliformes e tipo goela com abertura ampla em *S. eumorpha* e *S. brasiliensis* (Figura 3A).

Este resultado indica que, de maneira geral, caracteres florais nestas espécies refletem corretamente os sistemas de polinização. Na literatura, freqüentemente, as plantas são categorizadas com base nas características florais que correspondem às reconhecidas síndromes de polinização (cf. Faegri & Pjil 1980). Neste estudo, os resultados apóiam as síndromes de polinização indicadas por Perret *et al.* (2001, 2003) para a maioria das espécies. Entretanto, a análise detalhada das características florais e as observações sobre os polinizadores de *P. sericiflora* e *P. gracilis* refletem as incongruências quanto às síndromes de polinização inferidas.

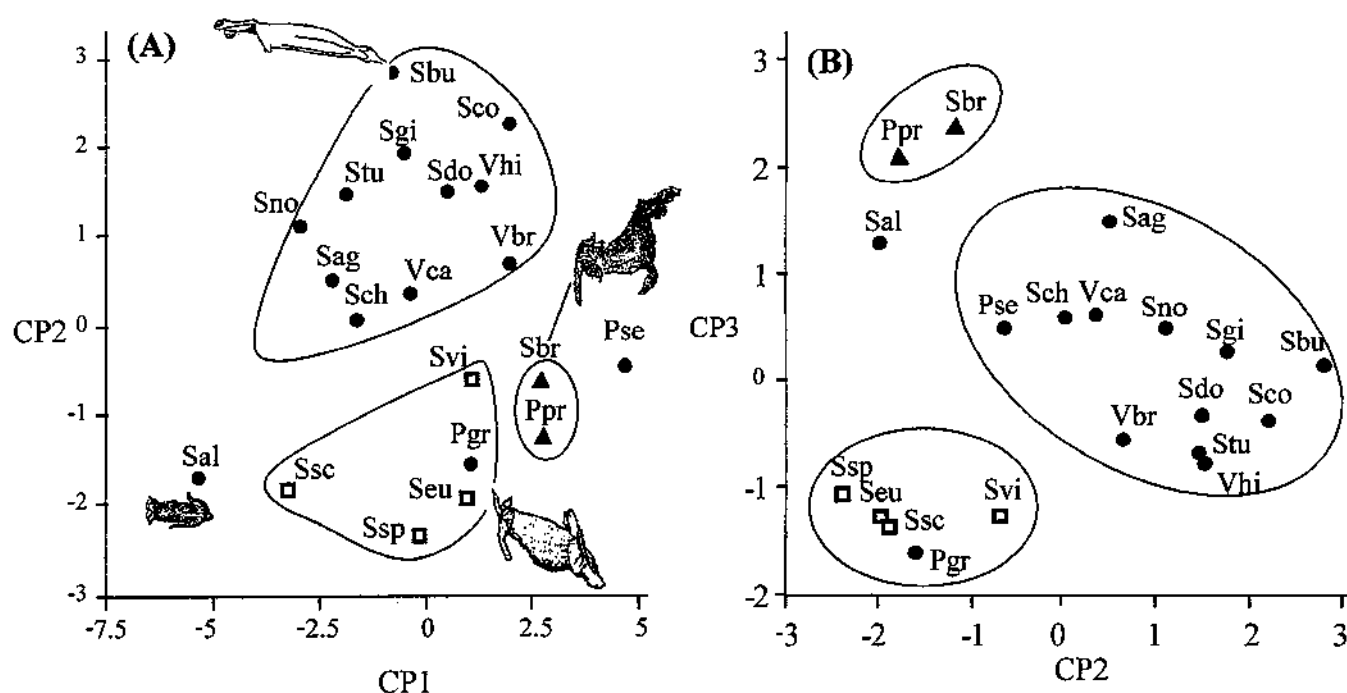


Figura 4. Diagrama dos componentes principais obtidos através da análise de ordenação. Os símbolos representam os tipos de polinizadores de cada espécie: (●) beija-flores, (□) abelhas e (▲) morcegos. A - primeiro e segundo componentes principais ordenaram as espécies em relação ao tamanho e a forma das flores. B - segundo e terceiro componentes principais ordenaram as espécies em relação à forma e a características do néctar.

Estas duas espécies apresentam características morfológicas semelhantes às descritas para as síndromes de polinização de quiropterofilia e melitofilia, respectivamente. No entanto, as flores de *P. sericiflora* são geralmente tubulares e longas, podendo ocorrer também formas campanuladas, e em ambos os casos a abertura da corola é ampla. Devido a estas características esta espécie aparece próxima de *S. brasiliensis* e *P. prasinata* (Figura 3A), ambas polinizadas por morcegos. No entanto, quando as características do néctar são consideradas como em CP2-CP3, *P. sericiflora* se agrupa com as espécies polinizadas por beija-flores (Figura 3B). Esta espécie apresenta características florais intermediárias entre as duas síndromes, porém é efetivamente polinizada apenas por beija-flores (capítulo III). No caso de *P. gracilis*, a morfologia das flores também varia de campanulada a tubular, a coloração e a concentração do néctar se encaixam na síndrome de melitofilia. Embora esta espécie receba raras visitas de abelhas (*Centris* sp., *Euglossa* sp. e *Bombus morio*), é polinizada efetivamente por beija-flores. Dados adicionais são necessários para resolver a incongruência encontrada entre as síndromes de polinização e os polinizadores efetivos destas duas espécies. Por exemplo, estudos que quantifiquem a variação nas formas florais

intra e interpopulacional, e procurem associar estas variações com os polinizadores efetivos destas espécies.

A análise de contrastes filogenéticos independentes mostrou que o segundo componente principal e o comprimento das estruturas reprodutivas são significativamente associados à mudança dos sistemas de polinização, enquanto que outros caracteres, como características do néctar não estão relacionados. Este resultado, provavelmente, é devido à grande variação intraespecífica nos dados de volume e concentração de açúcares no néctar na maioria das espécies (ver média e desvios no Apêndice 1). A média dos contrastes de CP2 foi significativamente diferente de zero nos nós onde ocorreu mudança para polinização por beija-flores (6 contrastes, $r^2 = 0,76$; $F = 15,61$; $p > 0,01$) e por abelhas (4 contrastes, $r^2 = 0,81$; $F = 12,81$; $p > 0,05$), bem como quando analisado o tamanho do aparelho bucal dos polinizadores (22 contrastes, $r^2 = 0,44$; $F = 14,38$; $p > 0,001$). Considerando que o segundo componente principal (CP2) reflete principalmente a variação na forma floral (comprimento vs. diâmetro – Tabela 2), este resultado sugere que a morfologia da flor é fortemente relacionado com os sistemas de polinização. Em adição, o comprimento do filete e estilete tem forte contribuição em CP2 destacando assim a importância deste carácter em relação aos polinizadores. Esta relação fica clara quando analisados estes caracteres (comprimento do filete e estilete) isoladamente. Os contrastes filogenéticos entre comprimento do filete foram significativos quando ocorreu mudança de sistema de polinização por abelhas (4 contrastes, $r^2 = 0,89$; $F = 24,72$; $p > 0,01$). Similarmente, as estruturas reprodutivas foram fortemente associadas ao tamanho das partes bucais dos polinizadores, tanto para o comprimento do filete (22 contrastes, $r^2 = 0,45$; $F = 17,22$; $p > 0,0005$) como para o comprimento do estilete ($r^2 = 0,45$; $F = 17,25$; $p > 0,0005$).

O tamanho das estruturas reprodutivas também foi fortemente associado a mudança de polinizador em *Mimulus*, seção *Erythranthe* (Beardsley *et al.* 2003). Nas espécies aqui estudadas, estames e pistilos longos (exsertos) são comumente encontrados nas espécies polinizadas por beija-flores e/ou morcegos, enquanto que estruturas reprodutivas insertas são encontradas apenas em espécies polinizadas por abelhas. Assim, podemos sugerir que esta característica pode ser associada ao comportamento dos polinizadores que podem pairar ou pousar ao visitar as flores. O carácter tamanho das estruturas reprodutivas é importante para a efetiva remoção de pólen das anteras e a sua deposição sobre o estigma, influenciando diretamente na adaptabilidade das espécies (Beardsley *et al.* 2003).

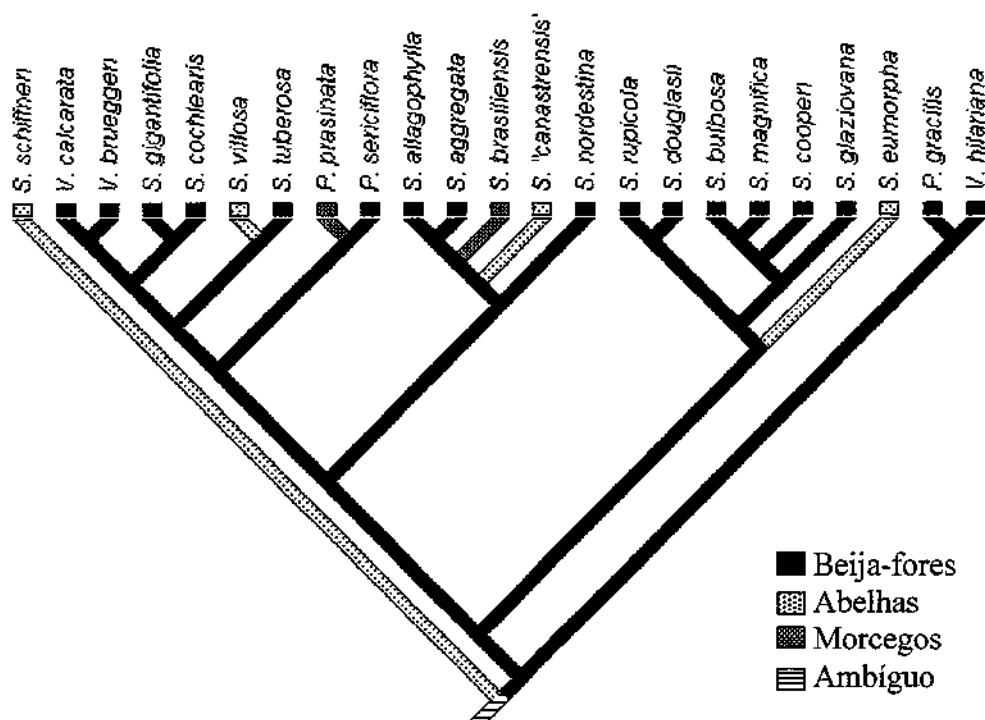


Figura 5. Mapeamento dos principais grupos de polinizadores sobre o cladograma obtido para 23 espécies da tribo Sinningieae conforme as relações filogenéticas apontadas por Perret *et al.* (em prep. – ver Figura 2).

Os beija-flores predominam como principais polinizadores em todos os clados apontados por Perret *et al.* (2003), exceto no clado *Thamneligeria*, onde se insere *S. schiffneri* (Figuras 2 e 4). Entretanto, mudanças no tipo de polinizador ocorrem em três clados (*Sinningia*, *Corytholoma* e *Dircaea*). Este resultado indica múltiplas mudanças entre os sistemas de polinização na tribo, de modo que a polinização por morcegos em *S. brasiliensis* e *P. prasinata*, ou por abelhas em *S. eumorpha*, *S. villosa* e *S. "canastrensis"* tiveram origem independente (Figura 4). Em adição, as diferenças na morfologia floral e nos gupos de abelhas polinizadoras das espécies aqui estudadas (capítulo I), refletem a origem independente deste sistema da polinização em clados da tribo. Em outros gêneros de Gesneriaceae, nos quais são inferidas as síndromes de polinização com base nas características florais, tais como *Achimenes* (Roalson *et al.* 2003) e *Streptocarpus* e *Saintpaulia* (Harrison *et al.* 1999), também são sugeridas múltiplas origens nos sistemas de polinização.

O mapeamento dos polinizadores sobre o cladograma indica um estado ancestral ambíguo, entre abelhas e beija-flores como agentes polinizadores nas espécies da tribo Sinningieae (Figura 4), este resultado também foi encontrado por Perret *et al.* (2003), com base nas síndromes de

polinização, em cerca de 80 espécies da tribo Sinningieae. Um estudo com número maior de espécies nos clados basais como, *Thamneligeria* e *Vanhouttea* “dialisepalo”, pode não resolver esta questão pois as espécies que compõem estes clados são melitófilas e ornitófilas, respectivamente (ver Apêndice 3) e, portanto, o resultado levaria a nova ambigüidade. Sugerimos que estudos sobre a biologia da polinização de espécies de tribos próximas à Sinningieae - como Episcieae que parece ser tribo irmã de Sinningieae (Zimmer *et al.* 2002) e possui 11 gêneros com diversas formas florais - poderiam ser úteis para esclarecer a ancestralidade do sistema de polinização nesta tribo.

BIBLIOGRAFIA

- Armbruster W. S. 1992. Phylogeny and the evolution of plant-animal interactions. *BioScience* 41: 12-20.
- Armbruster W. S. 1993. Evolution of plant pollination systems: hypotheses and tests with neotropical vine *Dalechampia*. *Evolution* 47: 1480-1505.
- Armbruster W. S., Edwards M.E. & Debevec E.M. 1994. Floral characters displacement generates assemblage structure of western Australian triggerplants (*Stylidium*). *Ecology* 75:315-329.
- Armbruster W. S. 1996. Evolution of floral morphology and function: an integrative approach to adaptation, constraint, and compromise in *Dalechampia* (Euphorbiaceae). In: D. G. Lloyd & S.C.H. Barrett (Eds.) *Floral biology: studies on floral Evolution in animal-pollinated plants*. Chapman & Hall, New York. p. 241-272.
- Armbruster W. S. 2002. Can indirect selection and genetic context contribute to trait diversification? A transmission-probability study of blossom-colour evolution in two genera. *J. Evol. Biol.* 15:468-486.
- Armbruster W. S., Mulder C.P.H., Baldwin B.G., Kalisz S., Wessa B. & Nute H. 2002. Comparative analysis of late floral development and mating-system evolution in tribe Collinsieae (Scrophulariaceae s.l.) *Amer. J. Bot.* 89:37-49.
- Barrett S.C.H., Harder L.D. & Worley A. C. 1996. The comparative biology of pollination and mating in flowering plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 351: 1271-1280.
- Beardsley P. M., Yen A. & Olmstead R.G. 2003. AFLP phylogeny of *Mimulus* section *Erythranthe* and the evolution of hummingbird pollination. *Evolution* 57(6): 1397-1410.
- Bruneau A. 1997. Evolution and homology of bird pollination syndromes in *Erythrina* (Leguminosae). *Amer. J. Bot.* 84(1): 54-71.

- Buzato S., Sazima M. & Sazima I. 2000. Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic forest sites. *Biotropica* 32(4b): 824-841.
- Chautems A. & Weber A. 1999. Shoot and inflorescence architecture of the neotropical genus *Sinningia* (Gesneriaceae). In *The evolution of plant Architecture* (Kurmman, M. H. and Hemsley, A. R., eds.), London Kew: Royal Botanic Gardens, pp. 305 - 332.
- Chautems A., Baracho, G. S. & Siqueira-Filho J.A. 2000. A new species of *Sinningia* (Gesneriaceae) from northeastern Brazil. *Brittonia* 52(1): 49-53.
- Diniz-Filho J. A. F. 2000. Métodos filogenéticos comparativos. Editora Holos, Ribeirão Preto, SP. 162p.
- Faegri K. & van der Pijl L. 1980. *The principles of pollination ecology*. Oxford: Pergamon Press.
- Felsenstein J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *Am. Nat.* 125:1-15.
- Freitas L. 2002. *Biologia da polinização em campos de altitude no Parque Nacional da Serra da Bocaina, SP. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo.*
- Gimenez E.A., Ferrenrenzzi H. & Taddei V.A. 1996. Lingual morphology and cladistic analysis of the New World nectar-feeding bat (Chiroptera: Phyllostomidae). *J. Comp. Biol.* 1(1/2): 41-64.
- Grant V. & Grant K. A. 1965. *Flower pollination in the phlox family*. Columbia Univ. Press, New York. 180p.
- Grantsau R. 1989. *Os beija-flores do Brasil*. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura. 233p.
- Hapeman J. R. & Inoue K. 1997. Plant-pollinator interactions and floral radiation in *Plantanthera* (Orchidaceae). In: *Molecular evolution and adaptive radiation*. T.J. Givnish & K.J. Sytsma ed., Cambridge University Press. pp. 433-454.
- Harrison C.J., Möller M. & Cronk Q.C.B. 1999. Evolution en development of floral diversity in *Streptocarpus* and *Saintpaulia*. *Annal of Botany* 84:49-60.
- Harvey P.H. & Pagel M. 1991. *The omparative method in evolutionary biology*. Oxford Univ. Press, Oxford. 239p.
- Johnson S.D., Linder H.P. & Steiner K.E. 1998. Phylogeny and radiation of pollination system in *Disa* (Orchidaceae). *Amer. J. Bot.* 85(3): 402-411.
- Larson B.M.H. & Barrett S. C.H. 2000. A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biol. J. Linn. Soc.* 69: 503-520.
- Luckow M. & Hopkins H.C.F. 1995. A cladistic analysis of *Parkia* (Leguminaceae: Mimosoideae). *Am. J. Bot.* 82:1300-1320.
- Maddison W. P. & Maddison D. R. 1992. *McClade*, version 4.0. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.

- McDade L. A. 1992. Pollinator relationships, biogeography, and phylogenetics. *BioScience* 42: 21-26.
- Miles D.B. & Dunham A.E. 1993. Historical perspectives in ecology and evolutionary biology: the use of phylogenetic comparative analyses. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24: 587-619.
- Miles D.B. & Dunham A.E. 1993. Historical perspectives in ecology and evolutionary biology: The use of phylogenetic comparative analyses. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24: 587-619.
- Monteiro L. R. & Reis S.F. 1999. *Princípios de morfometria geométrica*. Editora Holos, Ribeirão Preto, 188p.
- Pagel M.D. 1992. A method for the analysis of comparative data. *J. theor. Biol.* 156: 431-442.
- Perret M., Chautems, A., Spichiger R., Geoffrey K. & Savolainen V. 2003. Systematics and evolution of tribe Sinningieae (Gesneriaceae): evidences from phylogenetic analyses of six plastid DNA regions and nuclear NCPGS. *American Journal of Botany* 90: 445-460.
- Perret M., Chautems A., Spichiger R., Peixoto M. & Savolainen V. 2001. Nectar sugar composition in relation to pollination syndromes in Sinningieae (Gesneriaceae). *Annals of Botany* 87: 267-273.
- Purvis A. & Rambaut A. 1995. Comparative analysis by independent contrast (CAIC): an Apple Macintosh application for analysing comparative data. *Computer Appl. Biosciences* 11: 247-251.
- Rebelo A.G. & Siegfried W.R. 1985. Colour and size of flowers in relation to pollination of *Erica* species. *Oecologia* 65: 584-590.
- Roalson E. H., Skog L. E. & Zimmer E. A. 2003. Phylogenetic relationships and the diversification of floral form in *Achimenes* (Gesneriaceae). *Syst. Bot.* 28(3): 593-608.
- Sakai S., Kato M. & Inoue T. 1999. Three pollination guilds and variation in floral characteristic of Bornean gingers (Zingiberaceae and Costaceae). *Am. J. Bot.* 86: 646-658.
- Sazima I., Buzato S. & Sazima M. 1996. An assemblage of hummingbird-pollinated flowers in a montane forest in southeastern Brazil. *Bot. Acta* 109: 149-160.
- Silveira F. A., Melo G. A. R. & Almeida E. A. B. 2002. *Abelhas do Brasil: Sistemática e Identificação*. Belo Horizonte : Edição do autor, 253p.
- Smith J. F., Wolfram J. C., Brown K. D., Carroll C. L. & Denton D. S. 1997. Tribal relationship in the Gesneriaceae: evidence from DNA sequences of the chloroplast gene *ndhF*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 50 - 66.
- Snow D.W. & Teixeira D. 1982. Hummingbirds and their flowers in the coastal mountains of SE Brazil. *Journal für Ornithologie* 123: 446-450.

- StatSoft, Inc. 2000. Statistic for Windows [Computer program manual]. Tulsa, Oklahoma, USA.
- Stebbins G.L. 1970. Adaptive radiation of reproductive characters in angiosperms. I Pollination mechanisms. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1: 307-326.
- Vasconcelos M.F. & Lombardi J.A. 2001. Hummingbird and their flowers in the campos rupestre of southern Espinhaço Range, Brazil. *Melopsittacus* 4: 3-30.
- Wiehler H. 1976. A report on the classification of *Achimenes*, *Eucodonia*, *Gloxinia*, *Goyazia* and *Anetanthus* (Gesneriaceae) *Selbyana* 1: 374-404.
- Zimmer, E. A., Roalson, E. H., Skog, L. E., Boggan, J. K. & Idnurm, A. 2002. Phylogenetic relationships in the Gesnerioideae (Gesneriaceae) based on nrDNA ITS and cdDNA trnL-F and trnE_T spacer region sequences. *Amer. J. Bot.* 89: 296 - 311.

Apêndice 1. Características florais das 23 espécies de Simningieae estudadas (medidas em centímetros). Números entre parênteses indicam o desvio padrão.

Espécies	Comp. do tubo	Comp. da corola	Diam. da corola horizontal	Diam. da corola vertical	Abertura horizontal	Abertura vertical	Comp. do estile	Comp. do filete	Diam. constric. nectário	Diam. câmara de nectar	Volume de néctar (µl)	Concentração de açúcar (%)
<i>P. gracilis</i>	3,38	3,40	2,51	2,54	1,59	1,55	2,29	2	0,44	0,48	13,70 (9,3)	34,9 (7,7)
<i>P. prasinata</i>	3,25	3,27	3,00	3,41	1,66	1,86	3,28	2,83	0,71	0,82	82,0 (37,7)	14,3 (3,6)
<i>P. sericiflora</i>	4,30	5,07	3,07	2,95	1,90	1,94	3,75	3,71	0,75	0,85	87,1 (41,8)	23,2 (2,0)
<i>S. aggregata</i>	2,25	2,60	0,96	0,38	0,96	0,39	2,34	2,43	0,35	0,69	6,6 (8,0)	22,5 (2,2)
<i>S. allagophylla</i>	1,39	1,49	0,93	0,86	0,43	0,36	0,69	1,16	0,34	0,41	2,3 (1,5)	18,7 (7,1)
<i>S. brasiliensis</i>	2,63	3,64	2,42	2,41	1,44	1,68	3,41	3,28	0,72	1,06	85,5 (42)	16,8 (2,6)
<i>S. bulbosa</i>	3,16	4,38	0,67	0,74	0,61	0,74	4,2	4,05	0,31	0,47	5,2 (4,1)	24,3 (6,4)
<i>S. canastrensis</i>	2,1	3,1	2,7	2,6	1,30	1,10	2,27	1,60	0,58	0,51	2,9 (3,7)	29,3 (5,1)
<i>S. cochlearis</i>	2,58	2,61	1,17	1,16	0,51	0,52	2,27	2,43	0,47	0,51	7,0 (6,1)	22,5 (5,3)
<i>S. cooperi</i>	2,66	6,10	0,94	0,21	0,75	1,97	6	4,97	0,48	0,83	3,0 (1,6)	29,5 (2,8)
<i>S. douglasii</i>	3,72	4,29	1,47	1,78	0,74	0,39	3,83	3,76	0,42	0,59	11,4 (4,6)	27,2 (2,5)
<i>S. eumorpha</i>	3,15	3,16	2,76	2,82	1,44	1,47	2,10	2,25	0,60	0,60	2,6 (1,3)	29,2 (2,6)
<i>S. gigantifolia</i>	3,72	3,90	1,15	1,07	0,54	0,55	3,53	3,42	0,37	0,51	10,4 (4,6)	22,5 (2,8)
<i>S. glazioviana</i>	4,34	5,99	0,89	1,09	0,68	0,90	4,45	4,64	0,43	0,61	-	-
<i>S. magnifica</i>	3,80	5,98	1,01	1,20	0,67	1,87	5,39	5,13	0,42	0,74	-	8,6
<i>S. nordestina</i>	1,96	2,95	1,50	1,75	0,26	0,83	3,15	2,86	0,16	0,32	3,15	14,2
<i>S. rupicola</i>	3,4	3,70	1,85	2,05	0,58	0,76	2,68	3,14	0,32	0,62	-	10,4
<i>S. schiffneri</i>	2,25	2,64	2,22	2,11	0,67	0,55	1,31	1,29	0,23	0,33	1,3 (1,2)	22,2 (5,6)
<i>S. tuberosa</i>	2,81	3,28	1,11	1,18	0,47	0,55	3,00	3,20	0,28	0,40	2,6 (1,8)	25,7 (8,6)
<i>S. villosa</i>	3,41	3,58	2,10	2,18	0,99	1,01	2,61	2,35	0,49	0,68	11,3 (6,5)	38,5 (1,3)
<i>V. brueggeri</i>	3,59	4,74	2,70	2,77	0,73	0,95	4,00	4,13	0,49	0,58	21,2 (11,6)	26,9 (3,2)
<i>V. calcarata</i>	2,86	3,01	1,62	1,50	0,43	0,74	2,91	2,85	0,45	0,53	24,1 (16,3)	23,1 (6,4)
<i>V. hilariana</i>	3,66	4,93	2,25	2,00	0,65	0,77	4,34	4,44	0,38	0,48	19,5 (10,0)	28,1 (3,7)

Apêndice 3. Espécies dos três grupos de polinizadores principais de espécies da tribo Sinningieae. Medidas do aparelho bucal e do comprimento do corpo em milímetros. Abreviações das espécies de plantas conforme tabela 1.

Polinizadores principais	Espécies de plantas polinizadas	Aparelho bucal	Comprimento total
Abelhas			
<i>Trigonopedia ferruginea</i>	Ssc	3,5	12
<i>Bombus morio</i>	Seu	6	17,5
<i>Eulaema cingulata</i>	Svi	11	22,2
<i>Eufriesea violascens</i>	Ssp	7,5	15,7
Beija-flores			
<i>Leucochloris albicollis</i>	Sal; Vbu; Vhi; Sch; Pgr	22	115
<i>Stephanoxis lalandi</i>	Vca	14	87
<i>Phaethornis pretrei</i>	Stu; Sdo	35	164
<i>Phaethornis eurynome</i>	Sco; Sag; Sgl; Sgi	33	144
<i>Chlorostilbon aureoventris</i>	Sbu	16,5	93
<i>Phaethornis ruber</i>	Sno	24	86
<i>Colibri serrirostris</i>	Pse; Sma; Sru	22	125
Morcegos			
<i>Glossophaga soricina</i>	Sbr	19	51
<i>Anoura caudifer</i>	Ppr	21	52

Considerações Finais

As espécies da tribo Sinningieae apresentam variação grande nos sistemas de polinização, envolvendo três grupos de animais como polinizadores principais: abelhas, beija-flores e morcegos. Além disso, as espécies estudadas apresentam diferenças em seus atributos florais, mesmo quando polinizadas pelo mesmo grupo de animais. Por exemplo, as flores das espécies polinizadas por abelhas diferem entre si tanto na forma, tamanho e coloração, como também na produção de néctar, o que reflete na polinização por uma variedade de abelhas de pequeno e grande porte. Nas espécies polinizadas pelos beija-flores também são identificadas diferenças no tamanho da corola e na produção de néctar. Neste caso, ao invés de estarem ligadas ao grupo de beija-flores polinizadores (i.e., Trochilinae e Phaethornithinae), as diferenças no comprimento e abertura da corola entre as espécies de *Vanhouttea* e *Sinningia* parecem refletir mais intensamente no local de deposição do pólen nos beija-flores. Estes resultados, com base em observações de campo, permitiram verificar a validade dos sistemas de polinização propostos anteriormente para as espécies da tribo, a partir das características morfológicas das flores (i.e., síndromes de polinização).

Nas espécies *Paliavana sericiflora* e *P. gracilis*, os polinizadores efetivos não coincidem com as síndromes de polinização inferidas por suas características florais. Além disso, a variabilidade dos caracteres florais (e.g., comprimento e abertura da corola e padrão de coloração) entre os indivíduos é acentuada nestas duas espécies, bem como, as diferenças na frequência de visitas de polinizadores entre populações. Devido a estes resultados, estas espécies constituem casos interessantes para estudos sobre seleção fenotípica de caracteres florais ligada à polinização por diferentes agentes ou pelo mesmo agente com frequência de visitas distinta. Um outro enfoque promissor é o estudo da estrutura genética entre as diferentes populações destas espécies, de modo a determinar se estas populações - com características florais distintas - estão isoladas reprodutivamente. Este tipo de estudo poderia ser estendido para as demais espécies de *Paliavana* (seis ao todo), uma vez que as relações inter- e intra-específicas são duvidosas no gênero.

Estudos sobre a biologia da polinização de espécies aparentadas são importantes para elucidar questões evolutivas de um determinado grupo taxonômico. Entretanto, a robustez das análises que envolvem comparações de espécies relacionadas depende de uma hipótese filogenética bem sustentada para o grupo e, também, do número de espécies analisadas. A análise comparativa dos atributos florais, tanto morfológicos como da produção de néctar, de 23 espécies da tribo Sinningieae mostra que a forma das flores (i.e., comprimento versus diâmetro) e o tamanho da estruturas reprodutivas são significativamente associados à mudança no grupo de animais

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

polinizadores (abelhas, beija-flores e morcegos). Embora estas análises tenham como base uma hipótese filogenética bem sustentada e envolvam uma porcentagem significativa das espécies de *Sinningieae*, a inclusão na análise de dados reprodutivos de outras espécies pode ser interessante para determinar a existência de outros caracteres relacionados aos sistemas de polinização, bem como, definir o provável sistema de polinização ancestral da tribo. Mais além, estes resultados podem contribuir tanto na elucidação de questões micro-evolutivas em espécies de *Sinningieae*, como para o estabelecimento de padrões macro-evolutivos na família *Gesneriaceae*.