

UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - UA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

**Polinização, sistema de cruzamento e fluxo gênico em
Caryocar villosum (Aubl.) Pers. (Caryocaraceae) uma
árvore emergente da floresta amazônica**

Rodrigo Lemes Martins

BIBLIOTECA DO INPA

Dissertação, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Concentração em Ecologia

Manaus – AM

2002

583 166045
M386p
ex 2

UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - UA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

**Polinização, sistema de cruzamento e fluxo gênico em
Caryocar villosum (Aubl.) Pers. (Caryocaraceae) uma
árvore emergente da floresta amazônica**

Rodrigo Lemes Martins

Rogério Gribel

Fontes financiadoras: CNPq, INPA/PPI 2-3310, PPG-7, PDBFF – IS/INPA,
WWF e FBMM



Dissertação, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Concentração em Ecologia

Manaus – AM

2002

Martins, Rodrigo Lemes

Polinização, sistema de cruzamento e fluxo gênico em *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers. (Caryocaraceae) uma árvore emergente da floresta amazônica/ Rodrigo Lemes Martins. – Manaus: INPA/UA. 2002.

63 p.

Dissertação de Mestrado

1. Biologia reprodutiva - plantas 2. Fluxo de pólen 3. Sistema de cruzamento 4. Microssatélites 5. *Caryocar* I. título

CDD 19ª ed. 581.16
581.522

Sinopse

No presente trabalho foi estudado a ecologia da polinização e o sistema de cruzamento de *Caryocar villosum* (Caryocaraceae). Pelo emprego de marcadores microssatélites avaliou-se a variabilidade genética da progênie de cinco plantas em ambiente alterado e em mata contínua, verificando a importância relativa da auto-polinização e da polinização cruzada na formação de sementes. Os resultados sugerem que o sistema de cruzamento misto e a polinização por um amplo espectro de visitantes tornam *C. villosum* resistente às alterações no ambiente que resultem na diminuição da densidade da espécie e/ou de seus polinizadores, porém as consequências genéticas da endogamia só poderão ser evitadas pela presença de polinizadores de longas distâncias.

Palavras Chaves: biologia reprodutiva - plantas, fluxo de pólen, sistema de cruzamento, microssatélites, *Caryocar*

Keywords: reproductive biology, pollen flow, mating system, microsatellites, *Caryocar*

Aos meus mestres...

AGRADECIMENTOS

Sou grato ao Dr. Rogério Gribel Soares Neto do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, à atenção, aconselhamento e orientação prestada em todas as etapas do trabalho e à Dr^a. Maristerra Rodrigues Lemes, INPA, pelos ensinamentos quanto aos procedimentos genéticos, análise dos dados e caracterização dos locos.

Agradeço também o Dr. Antonio C. Webber pelas considerações e correções no conteúdo do manuscrito e a M.Sc. Catarina da Silva Motta pela identificação das mariposas.

Nos procedimentos laboratoriais contei com a ajuda da Biol. Iara Nádia Alves de Oliveira e Camila Prette Faria da Universidade do Amazonas, meu agradecimento a ambas.

No trabalho de campo, foi fundamental o apoio de Marcelo Lima de Queiróz, M.Sc. Viviane Layme, Leonardo França, Everaldo Pereira, Tec. Aldenora Queirós, M.Sc. Cristiano Martins de Souza e M.Sc. Alexandre Colleto, meus sinceros agradecimentos a todos.

Agradeço o apoio técnico e financeiro do INPA (PPI 2-3310 e PPG-7) e do Projeto de Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais – PDBFF (projeto de colaboração binacional entre o INPA e o Center for Tropical Forest Science do Smithsonian Tropical Research Institute). Agradeço também ao apoio financeiro do Fundo Mundial para a Natureza – WWF e USAID além da Fundação Botânica Margaret Mee – FBMM.

Este trabalho é a dissertação de Mestrado de Rodrigo Lemes Martins, financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 130557 / 00 - 5.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	06
Capítulo 1: Biologia floral de <i>Caryocar villosum</i> (Caryocaraceae) uma árvore emergente da Floresta Tropical na Amazônia Central	07
Resumo	07
1.1 Introdução	07
1.2 Material e Métodos	08
1.3 Resultados	10
1.4 Discussão	17
Capítulo 2: Estudo do sistema de cruzamento e fluxo de pólen em <i>Caryocar villosum</i> (Caryocaraceae), por meio do uso de marcadores microssatélites	24
Resumo	24
2.1 Introdução	25
2.2 Material e Métodos	27
2.3 Resultados	30
2.4 Discussão	33
CONCLUSÕES	38
Anexo A: Tabelas e figuras do Capítulo 1	39
Anexo B: Tabelas e Figuras do Capítulo 2	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE TABELAS

Anexo A: Tabelas do Capítulo 1

TABELA 1. Resultado dos testes de polinização controlada nas flores de *Caryocar villosum* 40

TABELA 2. Características morfológicas das flores e inflorescências de *C. villosum* 41

Anexo B: Tabelas do Capítulo 2

TABELA 1. Características dos locos microssatélites analisados em *C. villosum* 49

TABELA 2: Genótipo de sete indivíduos adultos de *C. villosum* na Reserva Ducke. Tamanho dos alelos em pares de bases. Os valores entre parênteses se referem à distância das árvores em relação a matriz. Os indivíduos # 1, # 2, # 3, e # 4 localizam-se dentro da área de 9 hectares mapeada. Os indivíduos # 5 e # 6 se encontram fora da área mapeada 50

TABELA 3. Resultado da análise das cinco progênies de *C. villosum*, apresentando para cada uma: quantidade de sementes utilizadas na análise, número de locos analisados, número médio de alelos nos locos, média das heterozigosidades esperadas obtidas na análise dos locos, número mínimo de pais (doadores de pólen) da progênie genotipada, porcentagem de sementes resultantes de cruzamentos e fluxo de pólen detectado em algumas progênies

51

LISTA DE FIGURAS

Anexo A: Figuras do Capítulo 1

- FIGURA 1. Inflorescência de *C. villosum* com flores e botões **42**
- FIGURA 2. A) Volume de néctar produzido por flor (n = 15). B) Variação na concentração de açúcar ao longo do período em que a flor de *C. villosum* está aberta (n = 15). As barras verticais representam o desvio padrão **43**
- FIGURA 3. Visita de *Phyllostomus discolor* na flor de *C. villosum*. Note que o morcego pousa sobre a inflorescência e o pólen está depositado na superfície ventral da asa do animal **44**
- FIGURA 4. Visita de morcego glossofagíneo na flor de *C. villosum*. Note que devido ao vôo adejado, o morcego não pousa na inflorescência, tocando apenas a flor que está sendo visitada **45**
- FIGURA 5. Visita de Sphingidae na flor de *C. villosum* **46**
- FIGURA 6. Tempo de duração por horário aproximado das ondas de forrageamento (em minutos) do grupo de *P. discolor* em uma planta de *C. villosum*, setembro de 2001 **47**

Anexo B: Figuras do Capítulo 2

- FIGURA 1. Imagem de satélite do município de Manaus – AM. 1) Localização aproximada do indivíduos: INPA (1), Ducke (2), 1202 (3), 1103 (4) e ZF-3 (5). Fonte: Landsat5, cena 231-062 - 990915, INPE-IPAAM **52**
- FIGURA 2. Parentesco e segregação em duas famílias de meio irmãos de *Caryocar villosum*, oriundos de polinização aberta, visualizado em gel denaturante de poliacrilamida corado com nitrato de prata. A) Família 1202,

loco cb20. na primeira linha está o marcador de 10 bp (Gibco. MD), na segunda linha a matriz (genótipo 170/158) seguida dos 12 filhos (genótipos: 170/158, 170/170, 170/144, 158/150, 170/154, 162/158, 170/158, 170/150, 170/170, 170/158, 158/148, 158/148). B) Família INPA, loco cb05, na primeira linha está o marcador de 10 bp (Gibco. MD), na segunda linha a matriz (genótipo 149/149) seguida dos 9 filhos (genótipos: 149/139, 149/149, 153/149, 149/149, 149/149, 149/149, 153/149, 153/149, 149/131)

ABSTRACT

This study examined the floral biology, pollination ecology and breeding system of *Caryocar villosum* (Caryocaraceae), an emergent tropical forest tree with chiropterophyllous pollination. Nine microsatellite loci, previously used in a congener, were employed to investigate the reproductive system and pollen flow. Flowers of this species are mostly pale white, are positioned above the canopy on terminal inflorescences, have nocturnal anthesis, last only one night, have brush-like stamens and secrete a large amount of nectar (750 microliters per night): all characteristics typical of chiropterophylly. The open flower structure allows access to the nectar by landing bats (*Phyllostomus discolor*), hovering bats (Glossophaginae), hawkmoths and marsupials. Controlled pollination tests showed the species to be self-compatible. Genetic analysis of the mother plants and their half-sib seeds using microsatellites confirmed the controlled pollination results, but a larger percentage of fruits are formed if outcrossing is performed indicating that *C. villosum* is a mixed mating species. An approximately equal number of seeds (9-12) from each of five different trees were genotyped with microsatellites. Of all 55 seeds genotyped, 80% resulted from cross-pollination events, having at least one allele different from those of the mother plant. The remaining 20% were derived from self-pollination or from crosses with genetically similar trees. Seeds from three trees were entirely resulting from cross-pollination, which may be related to the presence of long-distance pollinators such as bats and sphinx moths. A fourth tree, visited only by marsupials during the time of observation, had 58% of its seeds derived from self-pollination. The fifth tree, isolated in a ten-hectare forest fragment, received pollen from at least three other trees, indicating pollen flow across at least 600m. The results of this study allow one to infer that a mixed-crossing breeding system and pollination by a wide spectrum of visitors make *C. villosum* tolerant of changes in its environment that result in reduced density of the tree and/or its pollinators. The genetic consequences of endogamy, however, can only be avoided if long-distance pollinators are present.

inferir a ocorrência de fluxo de pólen a uma distância de no mínimo 600 metros. Os resultados desse estudo sugerem que o sistema de cruzamento misto e a polinização por um amplo espectro de visitantes, tornam *C. villosum* resistente às alterações no ambiente que resultem na diminuição da densidade da espécie e/ou de seus polinizadores, porém, as conseqüências genéticas da endogamia só poderão ser evitadas pela presença de polinizadores de longas distâncias.

RESUMO

No presente trabalho foi estudado a biologia floral, a ecologia da polinização e o sistema de cruzamento de *Caryocar villosum* (Caryocaraceae), uma árvore emergente da floresta tropical. Foram utilizados nove locos microssatélites anteriormente desenvolvidos para uma espécie congênera, para investigar o sistema reprodutivo e o fluxo de pólen. As flores de *C. villosum* tem a forma de "pincel-de-estames", são predominantemente brancas, ficam expostas acima da copa em inflorescências terminais, apresentam antese noturna, duram apenas uma noite e secretam grandes quantidade de néctar (cerca de 750 μ l por flor por noite), características da síndrome de quiropterofilia. A estrutura aberta da flor permite que morcegos que pousam na inflorescência (*Phyllostomus discolor*), morcegos de vôo adejado (glossofagíneos), bem como mariposas esfingídeas e marsupiais tenham acesso ao néctar. Os testes de polinização controlada indicaram que esta espécie é auto-compatível. A análise genética de progênes oriundas de polinização natural, usando marcadores microssatélites, confirmou os dados dos teste de polinização, porém uma proporção maior de sementes é formada quando as flores são submetidas a polinização cruzada, indicando que *C. villosum* é uma espécie com sistema de cruzamento misto. Das 55 sementes de cinco árvores, genotipadas com microssatélites, 80% foram resultantes de eventos de fecundação cruzada, apresentando ao menos um alelo diferente daqueles encontrados na planta-mãe. As 20% restantes foram resultantes de auto-fecundação ou de cruzamentos entre plantas geneticamente aparentadas. Progênes originadas de três árvores, incluindo uma na área urbana de Manaus, apresentaram somente sementes de cruzamentos, o que provavelmente está relacionado com a presença de polinizadores de longa distância, como morcegos e esfingídeos, na área de ocorrência desses indivíduos. Em contraste, uma árvore localizada em uma área onde se registrou somente visitas de marsupiais, 58% das sementes apresentaram genótipo consistente com auto-fecundação. A análise de uma progênie de onze sementes coletadas de um indivíduo isolado em fragmento de 10 hectares, apresentou um número mínimo de três árvores doadoras de pólen, permitindo

INTRODUÇÃO

Estudos na floresta tropical têm evidenciado uma alta diversidade de espécies vegetais e de polinizadores. Essa diversidade sugere a existência de grande número de estratégias de reprodução e de interações interespecíficas, bem como uma grande heterogeneidade na estrutura genética de comunidades (BAWA 1990, JANZEN 1980). A intrincada rede de interações entre as espécies e o meio na floresta tropical, faz com que mudanças na densidade ou no comportamento do polinizador, possam ocasionar efeitos críticos na fertilização e sucesso reprodutivo das plantas (JAMES *et al.* 1998).

Árvores do dossel são os principais elementos estruturais da floresta tropical. Essas espécies podem ocorrer na densidade de um adulto, ou menos, por hectare. A maioria dessas espécies é autoincompatível, fazendo com que suas populações reprodutivas cubram grandes áreas o que pode torna-las susceptíveis à fragmentação. Porém, mesmo que a fragmentação possa ocasionar a perda de microhabitats únicos, as populações podem não ser afetadas em sua reprodução uma vez que o polinizador pode cobrir grandes distâncias, não sendo limitado pelo tamanho dos fragmentos (CHASE *et al.* 1996b, HAMILTON 1999, LOVELLES 1992). Alterações no padrão de forrageamento dos polinizadores podem afetar os cruzamentos e conseqüentemente a diversidade genética da progênie da planta (NASON *et al.* 1996, SILVERTOW e DOUST 1993).

A conseqüência genética da diminuição da população é o aumento da endogamia e manifestação da carga genética que está escondida no genótipo em forma de alelos recessivos deletérios. Em homozigose, os alelos recessivos podem manifestar suas características deletérias, ocorrendo em maior freqüência, quando a população que está fazendo parte do espectro de cruzamentos promovidos pelo polinizador, é formada por indivíduos geneticamente aparentados. Os efeitos da manifestação de recessivos deletérios vão desde a diminuição do vigor até queda da fertilidade (HAMRICK e NASON 2000).

O estudo da biologia reprodutiva de árvores tropicais tem sido objeto de grande interesse da comunidade científica para atender a crescente necessidade

de compreender como é possível manter a biodiversidade. Os dados sobre a reprodução de uma espécie, como sistema sexual, mecanismos de incompatibilidade, padrão de floração e processo de polinização podem nortear a adoção de estratégias de manejo e manutenção de populações e ecossistemas, pois a manutenção da variabilidade genética, permite a adaptação a uma maior gama de condições ambientais e está diretamente relacionada com a sobrevivência das populações no ambiente (KAGEYAMA 1990, HAMRICK e NASON 2000).

Com o advento de técnicas de biologia molecular como isoenzimas, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e microssatélites, tem-se determinado, de maneira mais direta a estrutura genética das populações e o modo pelo qual as frequências alélicas variam de uma geração para outra. O entendimento da estrutura e dinâmica genética permite a utilização apropriada dos recursos genéticos florestais (CHASE *et al.* 1996a, HAMRICK *et al.* 1995, KAGEYAMA 1990, NEWTON *et al.* 1999). Assim, o estudo da biologia reprodutiva, através da aplicação de técnicas clássicas de biologia da polinização, em conjunto com o uso de ferramentas da biologia molecular tem permitido que se faça um paralelo entre comportamento do vetor do pólen e a estrutura genética e como essa relação se regula (SILVERTOW e DOUST 1993).

A família Caryocaraceae consiste de 26 espécies distribuídas em dois gêneros, *Caryocar* L. e *Anthodiscus* G. F. W. Meyer, exclusivamente encontrados na Região Neotropical. O gênero *Caryocar* agrupa 16 espécies, das quais, apenas quatro não são endêmicas de áreas de Floresta Tropical (ARAÚJO 1995, PRANCE e SILVA 1973, PRANCE 1990). Nas áreas adjacentes à Cidade de Manaus são encontradas três espécies (uma delas com duas sub-espécies): *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers., *C. pallidum* A.C.Sm., *C. glabrum* (Aubl.) Pers. ssp. *glabrum* e *C. glabrum* (Aubl.) Pers. ssp. *parviflorum* (A.C.Sm.) Prance & M.F. da Silva (RIBEIRO *et al.* 1999). Para essas espécies, há registro de polinização por morcegos apenas em *Caryocar villosum* (VOGEL 1968). Outros estudos que abordam questões relativas ao polinizador de espécies do gênero são os realizados em *Caryocar brasiliense* Camb.(GRIBEL e HAY 1993), *Caryocar microcarpum* Ducke (Nogueira

comunicação pessoal) além de relatos de coleta de pólen de *Caryocar* sp. em pêlos de *Phyllostomus discolor* (WILLING 1983). Entre todos os trabalhos citados, apenas Gribel e Hay (1993) abordam as questões relativas à biologia floral, ecologia da polinização, o sistema de cruzamento e outros aspectos da biologia da planta.

O conhecimento do sistema de compatibilidade e do fluxo de pólen em função do comportamento do polinizador pode levar à descrição da dinâmica genética das populações de árvores. Apesar dos registros de quiropterofilia em *Caryocar villosum* e do conhecimento da eficiência de morcegos em cobrir grandes áreas, pouco se sabe como essa característica afeta a estrutura genética das populações de árvores quiropterófilas.

Nos últimos anos o uso dos marcadores moleculares tem trazido avanços na pesquisa da ecologia reprodutiva das plantas. Numerosos marcadores do DNA têm sido desenvolvidos recentemente. Dentre esses, destacam-se os microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeat) por serem altamente informativos. Os microssatélites já foram desenvolvidos para algumas plantas tropicais como: *Theobroma* spp. (LANAUD *et al.* 1999), *Symphonia globulifera* L. (ALDRICH *et al.* 1998), *Eucalyptus* sp. (BRONDANI *et al.* 1998), *Pithecellobium* sp. (CHASE *et al.* 1996a), *Caryocar brasiliense* Camb. (COLLEVATTI *et al.* 1999), *Copaifera* sp. (CONDIT e HUBBELL 1991), *Carapa guianensis* Aubl. (DAYANANDAN *et al.* 1999), *Dinizia excelsa* Ducke (DICK e HAMILTON 1999), *Melaleuca* sp. (MIWA *et al.* 2000; ROSSETO *et al.* 1999), *Simarouba amara* Aubl. (RODRIGUEZ *et al.* 2000), *Shorea* sp. (UJINO *et al.* 1998) e *Swietenia humilis* (WHITE e POWELL 1997a).

Devido ao grande polimorfismo dos microssatélites, o uso desses é especialmente indicado para estudos do sistema de cruzamento e de paternidade, comparando o sucesso reprodutivo dos doadores de pólen em função da estrutura da população e dos mecanismos de compatibilidade, além de permitir traçar inferências quanto à eficiência do polinizador, níveis de endogamia e de alogamia (CRUZAN 1998).

Cada loco microssatélite precisa ser amplificado por um par de iniciadores, desenvolvidos especificamente para o mesmo. O conhecimento de que existe a

conservação das regiões que flanqueiam os microssatélites entre espécies relacionadas, permite a transferência de pares de iniciadores entre estas espécies (CHASE *et al.* 1996a, DAYANANDAN *et al.* 1997, FERREIRA e GRATTAPAGLIA 1998, WHITE e POWELL 1997b). A transferibilidade entre espécies congênicas já foi comprovada para os pares de iniciadores desenvolvidos para *Caryocar brasiliense*, onde foi constatado que as regiões que flanqueiam as áreas de microssatélites são conservadas entre *C. brasiliense*, *C. villosum*, *C. glabrum*, *C. pallidum*, *C. edule* e *C. coriaceum*. (COLLEVATTI *et al.* 1999). Os dez locos microssatélites desenvolvidos por Collevatti *et al.* (1999) para *C. brasiliense* combinados apresentaram alto poder de exclusão de paternidade ($Q = 0,99999995$).

O uso de marcadores moleculares com este nível de polimorfismo permite, por meio do mapeamento e genotipagem dos indivíduos do campo e posterior genotipagem da progênie, estimar o quanto as plantas vizinhas à planta mãe podem contribuir como doadores de pólen. Desta forma pode-se definir a distância dos cruzamentos para as plantas analisadas. A genotipagem dos indivíduos de um fragmento e de sua progênie pode revelar se as plantas dos fragmentos realizam cruzamentos somente com plantas do mesmo fragmento ou se o polinizador é capaz de transpor a distância em que o fragmento está de outra área florestal, tornando possível avaliar o impacto causado pela fragmentação nas espécies que dependem desse polinizador.

Esses dados são particularmente importantes para a conservação de *C. villosum*, que é uma espécie endêmica da Amazônia que ocorre nas florestas de terra firme e é conhecida regionalmente como piquiá. Nessa região, a polpa do piquiá é apreciada como condimento, sendo utilizada na produção de doces, manteiga e licor (ARAÚJO 1995, CAVALCANTE 1988, PRANCE e SILVA 1973). Da semente (castanha) é possível se extrair um óleo, empregado como lubrificante e combustível de lamparinas (ARAÚJO 1995). O piquiá tem seu ritidoma utilizado na medicina popular além de ser indicado como fornecedor de boa madeira para a construção de barcos (ARAÚJO 1995, CAVALCANTE 1988, PRANCE e SILVA 1973, VASTANO e BARBOSA 1983).

Neste trabalho, foram usados marcadores microssatélites para estudar a dinâmica de cruzamentos de árvores de *C. villosum* em locais com diferentes níveis de influência antrópica e os resultados foram comparados com os dados obtidos dos estudos sobre biologia reprodutiva e comportamento dos polinizadores.

OBJETIVOS

Este trabalho objetiva descrever a polinização e o sistema de cruzamento de *C. villosum* na região de Manaus, na Amazônia Central. Especificamente pretende-se:

- a) Descrever a biologia floral e a ecologia da polinização de *C. villosum*.
- b) Quantificar a importância relativa da auto-polinização e da polinização cruzada na formação da progênie.
- c) Avaliar, pela análise genética da progênie, o alcance do fluxo de pólen promovido pelos polinizadores da espécie.

Capítulo 1:

Biologia floral de *Caryocar villosum* (Caryocaraceae) uma árvore emergente da Floresta Tropical na Amazônia Central

Resumo

O piquiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers., Caryocaraceae) é uma árvore emergente comum na Amazônia central que tem sua madeira comercializada assim como seus frutos. No presente trabalho foi estudado a biologia floral a ecologia da polinização e o sistema de cruzamento de *C. villosum*. Foram observadas árvores em ambiente urbano, mata contínua e fragmentos de mata, descrevendo aspectos da interação polinizador-planta, assim como características das flores. Foram realizadas polinizações controladas para estudo do sistema de cruzamento. As flores de *C. villosum* tem a forma de "pincel-de-estames", são esbranquiçadas, ficam expostas acima da copa em inflorescências terminais, apresentam antese noturna, duram apenas uma noite e secretam grandes quantidade de néctar (cerca de 750 μ l por noite), características da síndrome de quiropterofilia. A espécie foi visitada por morcegos *Phyllostomus discolor* e *Glossophaga soricina* assim como por marsupiais arborícolas e mariposas Sphingidae. As polinizações manuais revelaram que o piquiá é autocompatível, mas que a formação de frutos em polinizações cruzadas é maior do que a observada em autopolinizações. A planta se mostrou como uma importante fonte de recurso alimentar para as espécies de polinizadores noturnos. *C. villosum* oferece um bom modelo para estudo da biologia reprodutiva de plantas quiropterófilas, pois morcegos polinizam um grande número de espécies de plantas tropicais.

1.1 Introdução

Árvores do dossel são os principais elementos estruturais da floresta tropical, sendo que essas espécies geralmente ocorrem na densidade de um adulto ou

menos por hectare. A maioria dessas espécies é autoincompatível, pressupondo que suas populações ocupem grandes áreas (CHASE *et al.* 1996a, HAMILTON 1999, LOVELESS 1992). Informações sobre sistema sexual, mecanismos de incompatibilidade, padrão de floração e processo de polinização podem nortear a adoção de estratégias de manejo e manutenção de populações, estudando a interação entre o polinizador e a planta (KAGEYAMA 1990, HAMRICK e NASON 2000).

A família Caryocaraceae é composta por 26 espécies distribuídas em dois gêneros, *Caryocar* e *Anthodiscus*. Nas áreas adjacentes à Cidade de Manaus são encontradas três espécies do gênero *Caryocar*: *C. villosum* (Aubl.) Pers., *C. pallidum* A.C.Sm., *C. glabrum* ssp. *glabrum* e *C. glabrum* ssp. *parviflorum* (A.C.Sm.) Prance & M.F. da Silva (ARAÚJO 1995, PRANCE e SILVA 1973, PRANCE 1990, RIBEIRO *et al.* 1999). Apenas em *Caryocar villosum* há registros da biologia reprodutiva da planta feitos por Vogel (1968), que observou a visitação de morcegos. Outros estudos relevantes de biologia reprodutiva no gênero são os realizados em *Caryocar brasiliense* Camb. por Gribel e Hay (1993) que abordam a questões relativas à biologia floral e o sistema de cruzamento.

Neste trabalho foram estudados a interação entre o polinizador e a planta analisando a biologia floral, o comportamento dos polinizadores e o sistema de cruzamento de *C. villosum*. Esta espécie é uma árvore emergente comum na Amazônia Central, sendo necessário à utilização de técnicas de escalada e uma boa infra-estrutura para instalação de plataformas que permitem o acesso às flores. Os dados de biologia reprodutiva são importantes para a preservação de *C. villosum*, que é uma espécie endêmica conhecida regionalmente como piquiá e que tem suas populações ameaçadas devido a fragmentação e o interesse comercial pela sua madeira (ARAÚJO 1995, CAVALCANTE 1988, PRANCE e SILVA 1973, VASTANO e BARBOSA 1983).

1.2 Material e Métodos

O trabalho foi realizado no município de Manaus com observações de campo nos dias 09, 21, 28 e 29 de agosto de 2000, na reserva florestal Adolpho

Ducke (Km 26, AM-010), 12, 13 e 14 de novembro de 2000, na mata da Universidade do Amazonas (UA) e nos dias 20, 21 e 22 de setembro de 2001, em uma árvore isolada em ambiente urbano, em frente ao Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA). As observações foram realizadas em seis árvores, estando quatro na reserva Adolpho Ducke. Todas as observações aconteceram em noites sem precipitação pluviométrica.

A partir das 17:30 h foram iniciadas as observações, registrando-se os dados relativos aos eventos florais de cinco inflorescências focais por noite de observação. As anotações consideraram o movimento e a duração temporal dos eventos assim como a funcionalidade das partes florais. As inflorescências focais tinham todas as visitas registradas. A quantidade de néctar e a concentração de açúcar foram quantificadas em intervalos de 01:30 h a partir do início da abertura das flores. As observações de eventos e visitas findavam após a queda das pétalas da inflorescência focal. O néctar foi coletado diretamente com uma seringa milimetrada em cinco flores por planta. Cada flor era mantida isolada de visitantes no período entre medições utilizando um saco de papel. A concentração de açúcar foi medida com um refratômetro manual.

Os experimentos de sistema reprodutivo foram realizados em três árvores de *C. villosum* da área da reserva florestal Adolpho Ducke. Os testes para verificar o sistema de cruzamento de foram feitos à noite, geralmente no período de 21:30 e 23:30 h e foram realizados em flores previamente ensacadas no mesmo dia por volta das 12:00 h. A polinização foi feita arrastando a superfície estigmática em uma lamínula de vidro previamente coberta de pólen. As flores ensacadas que receberam pólen de outra planta foram emasculadas para evitar autofecundação. Após a polinização, as flores voltavam a ser ensacadas até a manhã do dia seguinte. As flores tratadas foram acompanhadas até vinte dias após a polinização, intervalo em que os frutos já não eram mais abortados, exceto, devido à predação.

As características estruturais das flores foram anotadas e medidas diretamente em flores de 6 plantas. A presença de osmóforos foi evidenciada em flores de quatro plantas diferentes coletadas desde o estágio de botão até depois

da queda, utilizando vermelho neutro (KEARNS e INOUE 1993). A quantidade e viabilidade do pólen foi estimada em cinco anteras maduras e cinco anteras maduras de estaminódios de três plantas. O pólen foi considerado viável quando corado em vermelho por tetrazolio (0,2%). A medida do pólen e da superfície estigmática foi feita em 25 grãos de pólen e três estigmas com o auxílio de um Microscópio (Ocular: 15x Kyowa/escale e lâmina micrométrica: 5+100/100mm). Exsicatas do material estudado foram depositadas no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Referência - INPA 206.271).

Nas observações das visitas, utilizou-se lanternas com filtro vermelho para evitar mudanças no comportamento do visitante. Atenção especial foi dada ao comportamento dos visitantes em ordem de sua importância como potencial polinizador, sendo coletado dados referentes à frequência e tempo de cada visita. O recurso fotográfico auxiliou a análise do comportamento do visitante e da efetiva atuação do mesmo como polinizador. Os visitantes florais foram coletados nas noites não empregadas no trabalho de registro de visitas. Morcegos foram coletados com uma rede de neblina de 1,5/1m colocada próximo a inflorescência. Apenas um morcego foi colocado como referência na Coleção de Mamíferos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Referência – INPA 3972).

1.3 Resultados

A planta

Caryocar villosum é uma árvore emergente com uma copa ampla em função dos ramos que se desdobram a partir do fuste. Os galhos ultrapassam a copa-das outras árvores e suportam aglomerados densos de folhas formando uma cobertura contínua. A espécie floresce por um período que vai de agosto ao final de outubro e as inflorescências ficam bem acima da cobertura de folhas (13 – 24 cm), em um pedúnculo longo e pouco flexível. Os botões e flores ficam voltados para cima, podendo, cada inflorescência, produzir em média 25 botões verde-claros ($dp = 4$; $n = 12$) que florescem seqüencialmente na quantidade de um ou dois por noite (Figura 1).

Os botões, à medida que vão maturando, mantêm a coloração e o tamanho das sépalas. As pétalas crescem até atingirem um tamanho entre 20,8 e 32,7 mm e ficam amarelo-claro. Os botões maduros começam a abrir entre 17:00 e 19:00 h sendo que uma planta pode abrir seus botões em horários diferentes, havendo diferenças até mesmo entre botões de uma mesma inflorescência. As flores se abrem lentamente com uma seqüência de eventos que duram de 40 a 90 minutos. As flores de uma mesma planta geralmente gastam o mesmo tempo para completarem a abertura.

A seqüência de eventos começa com o afastamento das cinco pétalas côncavas que lentamente abrem espaço apicalmente, para a saída de poucas anteras. Nesta fase os filetes se encontram agrupados formando um tufo único espiralado e comprimido. Qualquer espaço entre as pétalas libera as anteras que estão sendo pressionadas por todo o tufo que começa a se estender. Antes que as pétalas se afastem completamente os filetes já se encontram estendidos na vertical. Os estames se encontram no centro do tufo de filetes, emergindo do ovário. Entre a base dos filetes e a câmara que circunda o ovário pode ser observado um anel de estruturas semelhantes a pequenos estames. As pétalas branco-amareladas continuam a se afastar, sendo acompanhadas pelos estames. Neste trabalho os estames menores com base hipertrofiada, provavelmente responsáveis pela produção de néctar, serão tratados como estaminódios *sensu* Prance e Silva (1973), apesar de produzirem pólen.

Pouco antes da abertura do botão e durante toda a seqüência de eventos da antese é possível sentir o odor adocicado e pouco agradável da flor. Porém, o odor aumenta quando a flor esta aberta e os dos osmóforos da parte interna das pétalas estão expostos, intensificando o cheiro liberado antes da abertura da flor. Os osmóforos estão distribuídos regularmente nas pétalas em áreas que não estavam em contato com outras pétalas antes da abertura do botão, assim, são encontrados em maior quantidade na face interna das duas pétalas mais internas e na face externa das duas pétalas mais externas do botão.

No final da antese, os estames (aproximadamente 234) e estaminódios (aproximadamente 41) desenham uma estrutura hemisférica de filetes brancos e

anteras amarelas ao redor de quatro estiletes verde-claros (Figura 1). Os filetes, com 58-77 mm de comprimento, expõem as anteras 5-20 mm abaixo do nível dos estigmas. Os estaminódios têm 20-33 mm de comprimento, incluindo sua base hipertrofiada que forma uma estrutura anelar ao redor câmara nectarífera. Essa câmara tem o raio de 4 mm e apresenta em seu centro em tons verde-claros, um ovário súpero, tretralocular com um óvulo por lóculo, sendo que de cada lóculo emerge um estilete. A câmara nectarífera abriga o néctar produzido pela planta.

A produção de néctar pela base dos estaminódios, pôde ser detectada já a partir do início da abertura da flor, quando as anteras começam a sair. Durante toda a antese e no período em que a flor está disponível à visitação, a quantidade de néctar secretado se mantém em torno de 164 μ l (dp = 52 μ l; n = 15), perfazendo aproximadamente 750 μ l por flor por noite. A concentração de açúcar foi constante ao longo do período em que a flor estava aberta, se mantendo em torno de 12,9% (dp = 1,4; n = 15) (Figura 2). Desde o início da antese, as anteras de deiscência longitudinal já estavam abertas, expondo o pólen em grumos que ficavam pulverulentos a partir de sua saída do botão. Qualquer agitação na flor liberava uma nuvem de pólen que se depositava em pétalas e outras peças florais.

O número médio de grãos de pólen nas anteras dos estames foi de 411,3 (dp = 115,6; n = 15) e nas anteras dos estaminódios foi de 195,73 (dp = 79,5; n = 15). O teste do tetrazólio mostrou que a percentagem média de pólen inviável nos estames foi de 9,28%, variando entre 4,83% e 20,85% (n=15), enquanto que nos estaminódios foi de 20,25%, variando entre 4,19% e 55,19% (n = 15). Multiplicando o número de grãos de pólen das anteras pelo número médio de estames (234) e estaminódios (41) a produção de pólen por flor chega à 94.366,7 grãos, sendo que 89,16% são viáveis. O tamanho médio dos grãos de pólen é de 3,8 μ m² (n=25), enquanto a superfície estigmática tem uma área de 23,6 μ m² (n=3), permitindo a deposição de aproximadamente 6-7 grãos de pólen nessa reduzida área.

Em três plantas da Reserva Ducke, todas ou parte das flores de algumas inflorescências não apresentavam antese completa. Nessas flores alguns ou todos os estigmas e estiletes não se distendiam completamente ficando murchos. A

produção de néctar podia ou não ser comprometida, entretanto, não foi percebida diferença na liberação do pólen. O acompanhamento de 17 flores com antese incompleta constatou que os ovários dessas flores foram abortados no dia anterior a abertura da flor não perdurando o mesmo tempo que os ovários abortados que foram fecundados por polinização manual (Tabela 1).

Entre 00:00 e 02:30 h, as pétalas estames e estaminódios são descartados juntamente com o néctar produzido pouco antes da abscisão. Na planta, restam apenas o ovário, as sépalas e os quatro estigmas, concluindo um ciclo de aproximadamente 7 h (n = 5 plantas) em que a flor é funcionalmente atrativa, podendo ser visitada pelos polinizadores.

Quanto ao sistema de cruzamento, os tratamentos de auto-polinização e de polinização cruzada obtiveram respectivamente 6,9 % e 14,8 % de sucesso na produção de frutos, conforme os resultados sumarizados na Tabela 1. Parte das flores das árvores onde foram feitos os tratamentos foram acompanhadas como controle, dentre essas, apenas as flores com antese completa produziram frutos (Tabela 1). As características morfológicas das flores e inflorescências de *C. villosum* estão descritas na Tabela 2.

Visitantes florais

Por volta das 17:00 h a copa ainda está iluminada pela luz do sol e os primeiros visitantes começam a surgir. Destacam-se como visitantes os beija-flores (Trochilidae - *Heliothrix aurita*, *Amazilia versicolor*, *Talurania furcata*), abelhas (Apidae), besouros (Lampiridae) e mariposas (Noctuidae), todos com diferentes comportamentos diante da flor.

Os beija-flores visitam a flor só até o anoitecer (18:30 h), neste período os se alimentam de néctar introduzindo o bico por entre a pequena abertura das pétalas e as poucas anteras expostas. As abelhas, que são pequenas em relação à flor, coletam o pólen depositado nas peças florais e no tufo de anteras. Neste mesmo período podem ser vistos besouros caminhando entre as anteras e as mariposas Noctuidae que se alimentam de néctar pousando nas sépalas e colocando sua probóscide por entre as pétalas e anteras até alcançar a câmara

nectarífera. À noite, os besouros e mariposas continuam a visitar as flores porém nesse período é mais intensa a atividade de mariposas Sphingidae, morcegos Philostomidae e pequenos mamíferos não voadores como Didelphideos.

Dentre todos os visitantes, os morcegos foram mais freqüentes ($\bar{x} = 13$ visitas/h; $dp = 1,2$; $n = 20$ flores). Em plantas que não eram freqüentadas por morcegos, o número de visitas de mariposas Noctuidae era superior ao número de visitas outros animais (aproximadamente 4 visitas por hora). As espécies de morcegos observadas forrageando o néctar do piquiá foram: *Glossophaga soricina* e *Phyllostomus discolor* sendo o último o principal visitante das flores que estavam mais acessíveis às observações focais.

As visitas de *P. discolor* iniciaram por volta das 19:00 h quando as pétalas das flores estavam afastadas o suficiente para expor a câmara nectarífera. As visitas diminuía quando as flores começavam a perder as pétalas, estames e estaminódios. A queda de parte das peças florais é favorecido pela visita de morcegos que visitavam a planta no final da noite. Nesse período, poucos morcegos forrageiam aproveitando o néctar preso aos estaminódios e que foram produzidos um pouco antes da planta descartar pétalas e androceu.

O grupo de *P. discolor* sobrevoa a árvore e os membros se lançam individualmente sobre as flores que se sobressaem da densa copa do piquiá. As flores mais internas à copa são acessadas pelos vãos entre os aglomerados de folhas formados por diferentes galhos da planta. A visita de *P. discolor* é feita quando o mesmo pousa sobre a inflorescência, o que dura aproximadamente 1 segundo ($dp = 0,4$ s; $n = 22$). O pouso/visitação ocorre quando o morcego chega por cima na flor e coloca a cabeça dentro da mesma, mantendo as asas arqueadas. Nesse ponto, seu vôo é interrompido por uma pausa no batimento das asas, que ficam um pouco abertas ou abraçam toda a inflorescência. Ainda com a cabeça dentro da flor, o morcego começa a arquear suas asas até que possam ser batidas novamente possibilitando a saída da inflorescência. Na saída o morcego lança seu corpo para traz saindo por cima ou por baixo da copa.

Durante o contato com a flor, o *P. discolor* coloca o focinho dentro do anel de anteras lambendo o néctar acumulado na câmara nectarífera e preso por

aderência aos estaminódios. A aproximação por cima é suficiente para que o morcego toque os estigmas e grande parte das anteras de uma ou mais flores que são contatadas quando a inflorescência é abraçada. Assim, o pólen de piquiá é depositado praticamente em toda a região ventral do morcego incluindo asas e eventualmente na cabeça (Figura 3). As visitas de *P. discolor* ocorrem em intervalos que variaram de 2 a 10 minutos nas noites de novembro quando esses dados foram coletados.

As flores de acesso mais difícil que geralmente não são visitadas por *Phyllostomus*, são visitadas por morcegos glossofagíneos que apresentam outro comportamento em sua visita. Com um vôo adejado e um pequeno tamanho corporal os glossofagíneos aproximam-se rapidamente da inflorescência e fazem um breve vôo adejado em frente à flor. Nessa posição, eles estendem as asas para traz e lançam a cabeça para frente colocando o focinho dentro da flor após esse breve contato os morcegos impulsionam o corpo para traz e saem em vôo. Os pequenos morcegos glossofagíneos fazem várias incursões rápidas (menos de 1 segundo) à mesma flor, descrevendo sempre a mesma rota, esse vôo repetido de ida e vinda se assemelhava ao movimento de um pêndulo. Devido ao tamanho corporal dos morcegos glossofagíneos, é possível que toquem somente as anteras pelo lado em que foi feita aproximação e visita, não tocando os estigmas que estão no centro do anel de anteras (Figura 4). O registro fotográfico de morcegos glossofagíneos indica que os visitantes apresentam uropatágio desenvolvido o que permite relacionar como polinizadores, morcegos dos gêneros *Glossophaga*, *Lonchophylla* e *Lionycteris*, descartando espécies do gênero *Anoura*. No entanto, observações pessoais sugerem que estes visitantes são *Glossophaga soricina*, pois são os glossofagíneos mais comuns em áreas urbanas onde foram feitos os registros. O fato de *G. soricina* ser considerado o glossofagíneo visitante de flores de *C. villosum* é respaldado pelo trabalho de Vogel (1968).

Nas observações realizadas no mês de setembro de 2001 em uma árvore na área urbana, o padrão de visitação de morcegos *P. discolor* foi do tipo "trap line", com grandes grupos visitando a planta em intervalos (Figura 6). Apesar dos

morcegos *G. soricina* terem sido notados durante toda à noite forrageando nas flores próximas do observador, o padrão de visitação do tipo "trap line" não pôde ser confirmado, pois suas visitas são mais crípticas, dificultando o registro dos morcegos na planta. As observações feitas em uma árvore florida no período de novembro de 2000 não registraram o padrão do tipo onda de atividade, típica do forrageamento em "trap line". Nas observações de novembro de 2000, uma flor de piquiá foi visitada até 100 vezes durante o período em que esteve exposta à visitação, porém em quatro noites de observação na reserva florestal Ducke as plantas não tiveram suas flores freqüentadas por morcegos, sendo registrado somente visitas de didelphidae.

As visitas das mariposas Sphingidae ocorreram durante toda a noite porém, não ultrapassaram duas por flor e não apresentaram a mesma interação demonstrada por morcegos e outros mamíferos. A visitação era realizada durante um vôo adejado em que a mariposa tocava estigmas e anteras enquanto lançava sua probóscide para o interior da câmara nectarífera (Figura 5). Essas visitas duravam apenas alguns segundos em que a mariposa voava irregularmente sobre a flor. Durante o trabalho foi coletado apenas um indivíduo de *Pachylia ficus* (Linnaeus 1758), com uma espirotromba de 47,2 mm.

Dentre os mamíferos não voadores que freqüentaram as flores do piquiá estão *Caluromys lanatus* e *Caluromys philander* (Didelphidae). Registrou-se a presença de grupos de até sete indivíduos de *Caluromys* forrageando nas flores de uma única árvore (18/09/2000 – 23:00h) da Reserva Ducke. As visitas ocorriam em qualquer horário durante o período de abertura da flor, porém as flores observadas foram visitadas somente uma vez durante toda à noite. Esses mamíferos caminhavam pelos galhos da planta e, usando a cauda para se equilibrar, chegavam até mesmo nas inflorescências mais na extremidade dos galhos. Durante a visitação seguravam a inflorescência e colocavam o focinho dentro das flores abertas tocando com a cabeça anteras e estigmas e então recuando com extrema agilidade para o galho à procura de outras inflorescências.

Uma das plantas da reserva florestal Adolpho Ducke manteve suas flores até as 07:20 h do dia seguinte à abertura. No período de luz do dia, que começa

as 05:40 h, registrou-se a visita de abelhas e beija-flores que perduraram até o início da queda das péntalas estames e estaminódios. Nessas visitas, os beija-flores introduziam o bico próximo à base da coroa de anteras até à câmara nectarífera sem tocar as anteras e estigmas da flor.

1.4 Discussão

Biologia floral

Caryocar villosum é uma espécie com características típicas da síndrome de quiropterofilia definida por vários autores (SAZIMA e SAZIMA 1978). Dentre essas características destacam-se: antese noturna, coloração esbranquiçada, estruturas resistentes e amplas, grande quantidade de néctar, localização fora da folhagem, odor forte e pouco agradável além de grande quantidade de pólen. A quiropterofilia está relacionada com estruturas que facilitam a polinização por morcegos apresentando características que tornam as flores conspícuas e acessíveis no período da noite.

O período de abertura, a produção de néctar desde o início da antese e principalmente a prematura liberação de odor favorece a inclusão da planta em rotas de polinizadores do tipo "trap line", que necessitam de grande quantidade de recursos no início do período de atividade. A abertura lenta contrasta com algumas plantas quiropterófilas como *Ceiba pentandra* (GRIBEL *et al.* 1999), *C. acuminata* (BAKER 1960), *Pseudobombax longiflorum* (ROCHA *et al.* 1991) e *Passiflora mucronata* (HEITALUS *et al.* 1974). A lentidão desse processo pode ser em função da dependência da circulação de uma grande quantidade de água. Esse fato é respaldado por observações de Vogel (1968), que inflorescências colhidas antes da abertura e colocadas em uma vasilha com água não completaram a antese.

A eventual necessidade de uma eficiente circulação de água poderá ser o fator responsável pela dificuldade na distensão de filetes, estiletos e estaminódios que acomete algumas flores de uma mesma planta. Caso o pólen dessas flores

seja viável, essas flores podem estar funcionando como doadoras de pólen, e funcionalmente atuando como flores estaminadas.

A constante produção de néctar durante todo o período de antese garante o retorno do polinizador. Parte desse volume é armazenado pela ampla câmara nectarífera e pela base dos estaminódios e outra parte, forma uma bolha de líquido que, devido a sua tensão superficial, fica presa por aderência aos inúmeros estaminódios. Sazima e Sazima (1978), já discutiram adaptações dos estaminódios aos polinizadores o que reforça o fato dessa estrutura ter a função de impedir a perda de néctar, fundamental à atração de animais dependentes de grande quantidade de recursos.

A produção contínua de um grande volume de néctar e a grande quantidade de flores dentre as quais poucas formam frutos e algumas não tem antese completa, contribuem para o aumento do "display" necessário à atração de animais com estratégia de forrageamento em grupo, dentre esses *Phyllostomus discolor* que pode forragear solitariamente ou em grupo, dependendo da disponibilidade de flores (SAZIMA e SAZIMA 1977). Esse fato é comprovado pela atração de indivíduos de *P. discolor* solitários no final da noite quando a maior parte das flores já caiu.

Em espécies quiropterófilas, a grande quantidade de pólen produzida para aumentar as chances de cruzamento só é efetiva se houver uma eficiente deposição de pólen no vetor que é de grande porte quando comparado com outros polinizadores. Em algumas plantas quiropterófilas o aumento na deposição de pólen no polinizador é favorecido pelo aumento do tamanho da antera que inevitavelmente entra em contato com o visitante, como é o caso de *Hymenaea stignocarpa* (GIBBS et al. 1999) e *Passiflora mucronata* (SAZIMA e SAZIMA 1978). Também é comum que todas as flores da inflorescência, atuem na deposição de pólen como as *Ceiba* (GRIBEL et al. 1999; BAKER 1960), porém, outras Bombacaceae quiropterófilas como *Pseudobombax* (GRIBEL 1998), seguem mais o estilo de *Caryocar villosum* e *C. brasiliense* (GRIBEL e HAY 1993) possuindo grandes flores com grande quantidade de anteras que formam uma bola de estames ou um pincel (BAKER 1960).

A disposição dos estames em forma de bola ou pincel torna impossível acessar a câmara nectarífera sem que se toque nas anteras depositando pólen em uma grande área do polinizador. Segundo Baker (1960), essa estratégia geralmente é observada em flores visitadas por morcegos grandes, enquanto flores quiropterófilas com anteras que promovem a deposição de pólen em uma região mais definida estão relacionadas com morcegos menores que possuem maior estabilidade no vôo como os glossofagíneos, garantindo um certo padrão nas visitas, como ocorre nas de beija-flores.

Segundo Heithaus *et al.* (1974), em interações em que o polinizador tem um grande tamanho corporal a alta produção de pólen, capaz de cobrir o todo o corpo do polinizador, aumenta as chances de cruzamento. Isso pode ser exemplificado em *Caryocar brasiliense*, congênera comum no cerrado do Brasil Central, em que o aumento da quantidade de pólen no corpo do polinizador é fundamental para que haja a polinização, pois a superfície estigmática pode receber apenas de 4-6 grãos de pólen (GRIBEL e HAY 1993). De maneira semelhante, *C. villosum* apresenta uma produção de aproximadamente 84.000 grãos de pólen viáveis por flor e uma superfície estigmática onde se alojam apenas 6-7 grãos de pólen. Apesar da pequena separação espacial entre as anteras e as superfícies estigmáticas (hercogamia), essa característica pode diminuir a possibilidade de auto-polinização (GRIBEL e HAY 1993, HEITHAUS *et al.* 1974). Cruden (1977), em sua discussão sobre a importância do alto número de grãos de pólen para garantir a polinização, propõe uma grosseira determinação do sistema de cruzamento baseado na razão entre a quantidade de pólen produzido e o número de óvulos. Considerando a razão pólen/óvulo para *C. villosum* (cerca de 21.034 grãos de pólen por óvulo produzido) podemos definir, baseado nos critérios de Cruden (1977), a espécie como xenógama, porém a alta produção de pólen parece estar mais relacionada ao tamanho do polinizador.

De acordo com Cruden (1977), 2 à 7 grãos de pólen são necessários para garantir a probabilidade de formação do fruto. Nesse sentido, em *C. villosum* e *C. brasiliense*, a quantidade de pólen que entra em contato com o estigma fica bem

próxima do limite do comprometimento da polinização o que pode justificar a autocompatibilidade.

Gribel e Hay (1993) usando o índice de auto-incompatibilidade descrito por Bullock (1985) encontraram em *C. brasiliense* um valor superior ao máximo utilizado para definir a espécie como autoincompatível. O mesmo índice foi calculado para *C. villosum* obtendo-se 0,46 (Tabela 1) que é superior ao índice obtido nos tratamentos em *C. brasiliense* (ISI= 0,29). Porém, Collevatti *et al.* (2001), utilizando marcadores moleculares, encontraram uma alta taxa de polimorfismo nas progênies de *C. brasiliense*, sugerindo que essa espécie apresenta um eficiente mecanismo de autoincompatibilidade que promove um aborto seletivo de frutos, cujo pólen provém de indivíduos parentais. Essa seria a justificativa para o baixo número de embriões que se desenvolvem por flor, a alta taxa de aborto que pode estar ocorrendo em detrimento da baixa quantidade de recursos. Assim, *C. brasiliense* pode ser uma planta com autogamia facultativa cuja taxa de aborto de frutos resultantes de autocruzamento é dependente da quantidade de recursos. Esse mecanismo pode se repetir em *C. villosum*, porém são necessárias análises genéticas das progênies para confirmar estas suspeitas (Capítulo 2).

Visitantes florais

A biologia floral de *Caryocar villosum* aponta que esta espécie apresenta síndrome de quiropterofilia, porém a diversidade de visitantes florais requer considerações relativas ao papel que cada espécie desempenha como polinizador. Os visitantes vespertinos freqüentam a flor no período inicial da antese quando os estigmas ainda não se distenderam, desta forma foram desconsiderados na discussão pela baixa chance de estarem influenciando na produção de frutos.

Gribel e Hay (1993) registraram a presença de mariposas Sphingidae em *C. brasiliense* concluindo que as espécies desse grupo que possuem a probóscide menor ou do mesmo tamanho dos estiletos podem contribuir para a polinização e, conseqüentemente, produção de frutos. Em *C. villosum* os esfingídeos que foram

observados em atividade na flor apresentam um tamanho de probóscide que favorece o contato com as anteras, reforçando a importância desses insetos na polinização da espécie.

Dentre os morcegos que visitam a flor do piquiá, *Glossophaga soricina*, visita principalmente flores da parte baixa da copa que não são acessadas por *Phyllostomus discolor*. Segundo Heithaus *et al.* (1974), a visitação repetida em uma mesma flor com movimentos pendulares é uma característica de *G. soricina*. Lemke (1984), descreve o comportamento de *G. soricina* como territorialista no início da noite, assumindo um padrão "trap line" com a diminuição na quantidade de recurso do território. Em *C. villosum* não foi possível registrar a adoção da estratégia do tipo "trap line", também, não foi notificada redução na quantidade recursos produzidos pela planta. As visita repetidas em apenas uma flor e principalmente a diminuição do movimento entre plantas pode estar afetando o número de cruzamentos realizados por *G. soricina*. Os registros fotográficos não confirmaram o contato do estigma de *C. villosum* com o corpo de *Glossophaga* que é um morcego pequeno com aproximadamente 9-10 g e antebraço de 32 - 37mm (TIMM e LAVAL 1998). Gribel e Hay (1993) registram que *G. soricina* visita massivamente as flores de *C. brasiliense*, sendo responsável por grande parte da polinização dessa espécie. Dessa forma, não pode-se descartar a possibilidade de *G. soricina* e outros glossofagíneos atuarem como polinizadores efetivos de *C. villosum*.

Phyllostomus discolor é maior que *G. soricina* (antebraço 55 – 67mm; TIMM e LAVAL 1998) o que sugere que esta espécie seja a principal polinizadora do piquiá. Esse morcego visita as flores em grandes grupos de indivíduos durante a execução de um trajeto que inclui várias plantas. Essa estratégia é conhecida como "ondas de forrageamento", pois uma mesma planta é visitada em intervalos regulares (HEITHAUS *et al.* 1974). A adoção dessas rotas se dá em função da quantidade de flores existentes em cada planta e favorecem cruzamentos entre indivíduos em floração. Nas plantas de *C. villosum* que floresceram em novembro não foi percebida a visitação de *P. discolor* em padrão de ondas de forrageamento. O fato dessa planta ser o último indivíduo de piquiá em floração,

pode ter contribuído para que um grande número de grupos de morcegos tenha incluído esta planta em seu trajeto o que pode mascarar os intervalos entre ondas de forrageamento. Isso reforça a importância de *C. villosum* na dieta dos morcegos e da alta produção de néctar que confere vantagens da inclusão dessa espécie em rotas de vários grupos de *P. discolor*.

Assumindo que os mamíferos não voadores que visitaram as flores de *C. villosum* morfologicamente e comportamentalmente atuam como vetores de pólen, definiu-se esse grupo como polinizadores, apesar de não saber-se a importância relativa desses visitantes na produção de frutos. A dinâmica de cruzamentos e o fluxo gênico promovido pelos mamíferos não voadores pode variar em função do deslocamento desses animais, o que está relacionado ao metabolismo animal e à quantidade de recurso oferecido (CARTHEW e GOLDINGAY 1997). *Caluromys lanatus* e *C. philander* foram os visitantes mais freqüentes, porém segundo Janson *et al.* (1981), esses animais têm uma mobilidade pequena concentrando sua atividade de forrageamento em apenas uma árvore por noite.

Janson *et al.* (1981), Gribel (1988) e Carthew e Goldingay (1997) descrevem as características da síndrome de polinização por mamíferos noturnos não voadores se assemelhando muito às características da síndrome de polinização por grandes morcegos discutida por Baker (1960). A síndrome de quiropterofilia para morcegos pequenos (BAKER 1960) possui características mais distintas das adaptações das plantas à mamíferos noturnos não voadores discutidas por Janson *et al.* (1981). Porém a síndrome de quiropterofilia para morcegos pequenos pode estar mais relacionada à síndrome de ornitofilia (SAZIMA e SAZIMA 1978), tendo evoluído provavelmente a partir de pressões seletivas exercidas por morcegos polinizando plantas ornitófilas no período crepuscular. O gênero *Bauhinia* L., possui espécies quiropterófilas, ornitófilas e *Bauhinia aculeata* apresenta um comportamento intermediário (HOKCHE e RAMIREZ 1990).

Assim, em uma visão geral tem-se: *Caryocar brasiliense* sendo polinizado principalmente por pequenos morcegos e por *Phyllostomus discolor* na região do Brasil Central (GRIBEL e HAY 1993), *C. villosum* visitada basicamente por mamíferos não voadores em uma área de mata e por *Phyllostomus discolor* e

Glossophaga soricina em área urbana. Um quadro semelhante é observado em *Ceiba pentandra*, visitada por mamíferos não voadores no sudeste do Peru (JANZON *et al.* 1981), por mamíferos não voadores e morcegos do gênero *Phyllostomus* na Amazônia Central (BAKER 1960, GRIBEL *et al.* 1999) e por morcegos Megachiroptera na África e em pequenas ilhas do pacífico (HARRIS e BAKER 1959, ELMQVIST *et al.* 1992). As variações na freqüência de potenciais polinizadores diminuem a previsão da visita de um polinizador específico, esse fato pode tornar vantajosa a adoção de um mecanismo de autogamia facultativa, que parece ocorrer em *Ceiba pentandra* (BAKER 1960, MURAWSKI e HAMRICK 1992, ELMQVIST *et al.* 1992, GRIBEL *et al.* 1999)

Percebe-se que *C. villosum* apresenta uma síndrome direcionada a morcegos grandes, mas também favorece outros polinizadores noturnos, como glossofagíneos, esfingídeos e marsupiais arborícolas, gerando a possibilidade da planta utilizar diferentes grupos animais como vetores de pólen. Essa estratégia generalista pode decorrer do fato de que árvores de grande porte possuem gerações muito longas, permitindo que vários polinizadores com suas curtas gerações se especializem à flor. Se muitos polinizadores forem eficientes, a planta não sofrerá pressões para reorganizar sua estrutura a favor de determinado animal, apresentando uma estrutura floral relativamente "aberta" que confere à planta a capacidade de se adaptar a várias espécies de visitantes florais, em várias áreas. Talvez essa seja uma justificativa para manutenção de sistemas de polinização pouco especializados que tem se mostrado comum na natureza (BAWA 1990, MACHADO e OLIVEIRA 2000).

Capítulo 2:

Estudo do sistema de cruzamento e fluxo de pólen em *Caryocar villosum* (Caryocaraceae), por meio do uso de marcadores microssatélites

Resumo

Este estudo visa quantificar a variabilidade genética da progênie de *C. villosum* em diferentes ambientes, verificando a importância relativa da auto-polinização e da polinização cruzada na formação das sementes. Foram utilizados nove locos microssatélites, anteriormente desenvolvidos para *C. brasiliense*, para análise de progênies de polinização aberta de cinco árvores adultas na região de Manaus, AM. Das 55 sementes genotipadas, 80% foram resultantes de eventos de fecundação cruzada, apresentando ao menos um alelo diferente daqueles encontrados na planta-mãe. As 20% restantes foram resultantes de eventos de auto-fecundação ou de cruzamentos entre plantas geneticamente aparentadas. As análises genéticas das progênies confirmaram que *C. villosum* é uma espécie com sistema de cruzamento misto. Os dados das cinco famílias, formadas pela árvore mãe e 9-12 sementes originadas de polinização natural, foram discutidos separadamente, pois refletem as situações particulares em que as matrizes se encontravam no campo. Progênies originadas de três árvores apresentaram somente sementes resultantes de fecundação cruzada, o que provavelmente está relacionado com a presença de polinizadores de longa distância, como morcegos e mariposas esfingídeas, na área de ocorrência desses indivíduos. Na quarta árvore, em contraste, registrou-se somente visitas de marsupiais e 58% das sementes apresentaram genótipo consistente com auto-fecundação ou com cruzamento entre árvores geneticamente similares. A análise da progênie de onze sementes do quinto indivíduo, isolado em um fragmento de 10 hectares, mostrou que quatro sementes foram resultantes de eventos de auto-fecundação, enquanto que as outras sete resultaram de cruzamentos com no mínimo três outras árvores,

o que permitiu inferir a ocorrência de fluxo de pólen a uma distância de mais de 600 metros. Os resultados desse estudo sugerem que o sistema de cruzamento misto e a possibilidade de ser polinizado por diversos animais noturnos torna *C. villosum* uma espécie resistente às alterações no ambiente que resultem na diminuição da densidade da espécie e/ou de seus polinizadores. No entanto, apenas as polinizações efetuadas por animais que cobrem grandes distâncias, como morcegos, podem evitar as consequências genéticas da endogamia.

2.1 Introdução

O estudo da complexa rede de interações ecológicas no dossel da floresta tropical é uma das últimas fronteiras do conhecimento humano. Trabalhos recentes mostram que a maioria das árvores que compõem o dossel ocorre em baixa densidade fazendo com que a distância entre indivíduos de uma determinada população seja grande quando comparada com árvores de florestas temperadas (STACY *et al.* 1996). A estabilidade das populações de árvore emergentes, bem adaptadas à distribuição espacial esparsa, sugere a existência de uma intrincada rede de interações das plantas com polinizadores e dispersores que garantam a reprodução das espécies vegetais e a manutenção de populações geneticamente viáveis.

As adaptações das espécies de plantas estão condicionadas ao comportamento dos polinizadores, assim como são afetadas por alterações na densidade dos mesmos (JAMES *et al.* 1998). A separação espacial entre indivíduos de uma espécie de planta em uma população pode ser insignificante quando comparada com a área de forrageamento dos polinizadores, normalmente animais alados com grande mobilidade. Na região tropical, esse fato confere resistência às populações de plantas às alterações ambientais que resultem em redução de densidade (CHASE *et al.* 1996b, HAMILTON 1999, LOVELESS 1992, COLLEVATTI *et al.* 2001). Porém, modificações nas interações planta-polinizador influenciam as taxas de cruzamentos e conseqüentemente afetam a variabilidade genética das progênies da planta (NASON *et al.* 1996, SILVERTOW e DOUST 1993).

Para entender melhor essas relações, o estudo da biologia reprodutiva de árvores tropicais tem sido bastante explorado. Dados sobre o sistema reprodutivo, mecanismos de incompatibilidade, padrão de floração e processos de polinização podem, quando combinados, fornecer a base científica para o manejo e manutenção adequada de populações e ecossistemas (KAGEYAMA 1990, HAMRICK e NASON 2000).

Caryocar villosum (Aubl.) Pers. (Caryocaraceae) é uma espécie endêmica da floresta Amazônica, comum na região da Amazônia Central. Observações de Vogel (1968) mostram que a espécie apresenta síndrome de polinização por morcegos, e dados recentes (presente estudo, Capítulo 1) indicam que *C. villosum* é polinizada principalmente por morcegos (glossofagíneos e *Phyllostomus discolor*) além de mariposas e marsupiais arborícolas. Os estudos do efeito desses polinizadores no fluxo gênico das plantas, geralmente enfocam a distância que estes vetores são capazes de promover cruzamentos (GRIBEL *et al.* 1999, CHASE *et al.* 1996a, COLLEVATTI *et al.* 2001, DICK 2001, Loveless *et al.* 1998).

Dessa forma, além dos clássicos trabalhos de biologia reprodutiva que investigam os sistemas de cruzamentos por meio de polinizações controladas e descrevem a ecologia da polinização, marcadores moleculares têm sido utilizados com frequência para quantificar o nível de alogamia das populações e indivíduos em plantas tropicais (COLLEVATTI *et al.* 2001, DICK 2001, LEMES 2000, Loveless 1992). Dentre os marcadores moleculares utilizados nestes estudos destacam-se os locos microssatélites ou SSR (Seqüências Simples Repetidas), por sua expressão codominante e multialelismo, possibilitando potencialmente a detecção e discriminação de todos os alelos de um determinado loco. Tais características tornam os locos microssatélites marcadores ideais na determinação da estrutura genética de populações, sistema de acasalamento, fluxo gênico e análise de paternidade de sementes (SILVERTOW e Doust 1993, Cruzan 1998).

A conservação de sítios de microssatélites entre espécies relacionadas tem sido observada em diferentes famílias de plantas (COLLEVATTI *et al.* 1999, DAYANANDAN *et al.* 1997, KIJAS *et al.* 1995, LANAUD *et al.* 1999, WHITE e POWELL 1997), tornando possível a transferência de marcadores entre espécies ou mesmo

gêneros relacionados utilizando primers heterólogos. A possibilidade de utilização de marcadores microssatélites desenvolvidos para uma determinada espécie em outras relacionadas, aumenta significativamente a relação custo/benefício no emprego desta tecnologia.

Recentemente, Collevatti *et al.* (1999) desenvolveram e caracterizaram marcadores para 10 locos microssatélites em *Caryocar brasiliense*, árvore que ocorre nos cerrados Brasileiros. No presente estudo esses marcadores foram utilizados para investigar o sistema de cruzamento e a distância do fluxo de pólen em cinco árvores de *C. villosum* na região de Manaus, na Amazônia Central.

2.2 Material e Métodos

Área de estudo

Todas as plantas utilizadas neste trabalho estão em áreas de terra firme da Amazônia Central, município de Manaus, Brasil, onde foram realizadas as observações sobre a biologia floral de *Caryocar villosum* (presente estudo, Capítulo 1). Das cinco plantas utilizadas como matrizes, duas estão em reservas que são áreas do PDBFF, à aproximadamente 80 km ao norte de Manaus (02° 25' S 59° 50W). Uma delas está isolada em um fragmento de 10ha com todas as árvores mapeadas da reserva 1202 e a outra está na mata contínua, na borda de uma área mapeada de 1ha da reserva 1103. Também foi estudada uma planta na estrada vicinal ZF-3 (80 km de Manaus) que dá acesso às áreas do PDBFF. A quarta planta se encontra no centro de uma área mapeada de nove hectares da Reserva Florestal Ducke (km 26, Rodovia AM 010; 02° 55' – 03° 08'S; 59° 54' – 59° 59'W) e a quinta está situada dentro da cidade de Manaus próxima às instalações do INPA. As cinco árvores estudadas estão representadas na Figura 1 e correspondem às matrizes que floresceram em 2000, desenvolveram frutos que pudessem ser coletados no início de 2001 e produziram plântulas para que aproximadamente dez sementes fossem utilizadas nas análises genéticas.

O clima na região é do tipo quente úmido, correspondente a clima Af ou tropical chuvoso, segundo a classificação de Köppen. A média anual de temperatura na região é de 26 °C com a precipitação anual de 2362mm \pm 400mm (MARQUES FILHO *et al.* 1981). Caracteristicamente é um clima sazonal sendo que na estação seca de junho a outubro, a média mensal de pluviosidade é inferior a 100mm, enquanto que, na estação das chuvas de fevereiro e março, ocorrem médias pluviométricas mensais superiores a 300mm (SCARIOT 1999).

Análises genéticas

Para a realização das análises genéticas foram coletadas folhas de indivíduos adultos de *C. villosum* as quais foram armazenadas em sílica gel e acondicionadas à - 20 °C até a extração do DNA. A extração do DNA de folhas foi feita baseada em protocolo CTAB modificado por Ferreira e Grattapaglia (1998). Também foi extraído DNA de células da radícula de sementes utilizando-se o Kit Nucleon Phytopure (Amersham Pharmacia Biotech). A quantificação do DNA extraído foi realizada comparativamente utilizando-se padrões de massa molecular conhecidas em géis de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Para a amplificação dos locos microssatélites, foram utilizados 10 pares de iniciadores previamente desenvolvidos para *Caryocar brasiliense* e com transferibilidade comprovada para *C. villosum* (COLLEVATTI *et al.* 1999).

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 13 μ l contendo 200 μ M de cada dNTP, tampão PCR 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), 0.9 μ M de cada primer, 2.5 mg/ml de BSA, 1U de Taq DNA polymerase e 7.5 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador MJ Research PTC-200 nas seguintes condições: 96 °C por 2 min., seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 min., 56 °C por 1 min., e 72 °C por 1 min., e uma etapa final de alongamento a 72 °C por 7 min.

Para a determinação dos genótipos os fragmentos amplificados foram analisados em gel denaturante de poliacrilamida 4% corado com nitrato de prata (BASSAM *et al.* 1991) e estimado o tamanho dos alelos em comparação com um marcador de massa molecular de 10-bp (Gibco, MD). A análise dos tamanhos

dos fragmentos foi conservativa adotando-se um intervalo de dois pares de base para cada alelo. No caso do aparecimento de bandas resultantes de produtos secundários da reação de PCR, considerou-se para genotipagem os fragmentos de maior tamanho no gel. Foram genotipadas cinco famílias compostas pela árvore mãe e 9-12 sementes ou plântulas originadas de polinização natural. As relações de parentesco e de cruzamento entre os indivíduos foram avaliadas verificando a presença de pelo menos um dos alelos maternos e o aparecimento de alelos não presentes na mãe, respectivamente.

Análise dos dados

Para caracterização dos locos microssatélites foram analisadas dez árvores adultas escolhidas aleatoriamente na população da região de estudo. Cada loco foi caracterizado quanto ao número de alelos, heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e probabilidade de exclusão de paternidade (Q) segundo Weir (1996). A determinação da heterozigozidade esperada foi feita utilizando o programa GENEPOP, versão 3.1 c (RAYMOND e ROUSSET 1998). Para o estudo do sistema reprodutivo foram analisadas cinco progênies de polinização aberta. O genótipo multilocos de cada progênie foi comparado ao genótipo multilocos da planta-mãe a fim de determinar se: (1) a progênie apresentava genótipo consistente com a autofecundação ou fecundação cruzada e (2) caso a origem fosse de fecundação cruzada, se a progênie apresentou genótipo consistente com cruzamento da planta-mãe com alguma das árvores adultas vizinhas, genotipadas. As progênies de polinização aberta foram caracterizadas quanto à média de alelos por loco, número mínimo de pais, heterozigosidade esperada (H_e) e fluxo de pólen detectado. O número mínimo de pais da progênie foi calculado considerando-se, para o loco mais polimórfico, o número de alelos encontrados em todos os indivíduos da progênie diferentes daqueles encontrados na planta mãe, dividido por dois.

O índice de autocompatibilidade foi calculado segundo Bullock (1985) através da fórmula:

$$ISI = \frac{\% \text{ de sementes de autofecundação}}{\% \text{ de sementes de cruzamento}}$$

2.3 Resultados

Caracterização dos locos

Dos 10 locos microssatélites desenvolvidos para *C. brasiliense* e analisados em *C. villosum*, apenas um (cb13) não amplificou. O número de alelos detectados por locos variou de 6 a 9 com média de 7.9 para os 9 locos analisados. A heterozigosidade esperada variou de 0.68 a 0.90 com média de 0.79 e a heterozigosidade média observada foi de 0.50 (0.30-0.70) (Tabela 1). A probabilidade de exclusão de paternidade variou de 0,46 a 0,73 entre os nove locos (Tabela 1). A análise dos 9 locos combinados indicou uma probabilidade de exclusão de paternidade de 0,9855, considerando-se as freqüências alélicas de apenas dez indivíduos analisados. A análise das cinco progênies de meios irmãos oriundas de polinização aberta confirmou a segregação mendeliana para os nove locos, ou seja, cada indivíduo da progênie exibiu ao menos um alelo idêntico ao da planta-mãe (Figura 2).

Análise das progênies

Os resultados refletem as situações particulares em que as matrizes se encontram no campo. Assim, a apresentação dos resultados acompanhará a descrição da localidade e das possibilidades de cruzamento das plantas que frutificaram em 2001. No total foram analisados 55 sementes, sendo que 44 foram resultantes de cruzamentos com outras árvores e 11 apresentam genótipo consistente com autofecundação. Utilizando índice de autocompatibilidade de Bullock (1985), em que 0,25 seria o limite para plantas auto-incompatíveis, *C. villosum* é uma planta no limite entre auto-compatibilidade e auto-incompatibilidade. Os dados das cinco progênies analisadas isoladamente, estão sumarizados na Tabela 3.

Indivíduo ZF-03

A planta localizada na estrada vicinal ZF-03 (70 km ao norte de Manaus) não se encontra em uma área mapeada, porém é considerada um planta de mata contínua, uma vez que a estrada é de pouco movimento e apenas em alguns pontos o contato entre copas é interrompido. Dessa matriz foram analisados doze sementes com o uso dos cinco locos que se apresentaram mais polimórficos (cb1, cb3, cb6, cb11 e cb 20). O número médio de alelos encontrados nos cinco locos foi de 5,2 alelos por loco. Com base no loco com maior número de alelos diferentes da planta mãe, essa progênie revelou que no mínimo três outras plantas foram responsáveis pela produção das doze sementes. Os resultados confirmaram que nessa progênie de doze sementes, todas originaram-se de polinização cruzada.

Indivíduo 1103

O indivíduo da mata contínua da reserva 1103 do PDBFF se encontra sozinho na borda de uma área de um hectare mapeada. Dessa matriz foram obtidas onze sementes que foram analisadas com os locos cb1, cb3, cb6, cb11 e cb 20. O número médio de alelos encontrados foi de 5,6 alelos por loco apresentando um número mínimo de três pais responsáveis pela polinização desta progênie. Os resultados confirmam que todas as onze sementes dessa matriz são originadas de fecundação cruzada.

Indivíduo 1202

A área mapeada 1202 é um fragmento de mata isolado por uma área de pastagem, distando aproximadamente 600 metros da mata contínua mais próxima. Além da matriz, há apenas mais um indivíduo de *C. villosum* neste fragmento. Da matriz foram analisadas onze sementes com os locos cb1, cb3, cb6, cb11 e cb 20. Juntamente com a progênie, foi analisada a planta que também ocorre no fragmento. Nas onze sementes, o número médio de alelos dos cinco locos foi de 4,8 alelos e ao menos três pais originaram essas sementes. Os cinco locos demonstraram que sete das onze sementes foram resultantes de cruzamento com outras árvores. Para as quatro sementes que não foram evidenciados

cruzamentos, foram feitas análises extras com os locos cb5, cb9, cb12 e cb 23, confirmando que eram provavelmente resultantes de autofecundação. A árvore que também se encontra no fragmento não é responsável por nenhuma das paternidades e não produziu frutos no mesmo período que a matriz analisada, não há informação disponível se a mesma floriu concomitante a matriz.

Indivíduo INPA

A planta localizada na área urbana em frente às instalações do INPA, se encontra isolada em uma área de alto trânsito de veículos, onde foram feitas parte das observações de campo descritas no Capítulo 1. Dessa matriz foram analisadas nove sementes com nove locos. O número médio de alelos encontrados nos nove locos foi de 4,1 alelos por loco, apresentando um número mínimo de três pais responsáveis por essa progênie de nove sementes. Os resultados confirmam que todas as nove sementes genotipadas dessa matriz são originadas de cruzamentos com outras plantas.

Indivíduo Ducke

A área mapeada de mata contínua da Reserva Florestal Ducke é de nove hectares. Nessa área encontram-se quatro plantas a distâncias de 73 metros, 125 metros, 148 metros e 193 metros da matriz, localizada no centro da área. Nessa mesma localidade mais dois indivíduos, um a 400 metros e outro a 284 metros da matriz, foram utilizados na análise juntamente com as quatro plantas da área de nove hectares. Assim, foram analisadas 12 sementes e seis possíveis pais com os locos cb1, cb3, cb6, cb11, cb 20, cb5, cb12 e cb 23. O número médio de alelos encontrado nas 12 sementes foi de 2,88 alelos por loco. Com base no loco com maior número de alelos diferentes da planta mãe, apenas um pai foi responsável por essa progênie. Das cinco sementes resultantes de cruzamento três são cruzamento com a planta a 73 metros, permitindo inferir que as duas sementes restantes são filhos de um segundo pai não localizado, mas que se encontra a uma distância superior a 150 metros que é a distância da matriz à borda da parcela mapeada. A média das heterogeneidades observadas foi 0,593 e das esperadas foi 0,534.

Das sete sementes que não resultaram de fecundação cruzada, três tinham genótipo compatível com autofecundação e os demais parecem ter sido originados de cruzamentos da planta mãe com os indivíduos da área mapeada que compartilham vários alelos com a matriz. Incorporando os dados dos quatro indivíduos mapeados na área de nove hectares da Reserva Ducke, a média de alelos por loco aumenta para apenas 3,75, mostrando que essa população é formada de indivíduos geneticamente similares. A Tabela 2 apresenta os alelos obtidos na análise da planta mãe e dos outros seis indivíduos da área mapeada. Devido ao grande compartilhamento de alelos, todos os indivíduos da área de nove hectares podem ser considerados filhos ou irmãos da matriz analisada, fato que não ocorre com os indivíduos mais distantes (284m e 400m), localizados fora da parcela.

2.4 Discussão

Os resultados mostram que os locos microssatélites constituem ferramenta eficiente para estudos de ecologia reprodutiva de *C. villosum*. A alta probabilidade de exclusão de paternidade encontrada nesse estudo ($Q = 0,9855$, considerando os nove locos) permite traçar inferências quanto ao fluxo de pólen e o sistema de cruzamento com um grau de precisão não obtido com técnicas clássicas de estudo de ecologia da polinização (DOW e ASHLEY 1996).

A caracterização dos locos realizadas em dez indivíduos adultos mostravam que as heterozigosidades observadas foram consideravelmente menor que as heterozigosidades esperadas, exceto para o loco cb5. Isso sugere a existência de um excesso de homozigotos na população em relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, que considera acasalamentos ao acaso na população. Tal observação pode ser explicada provavelmente pela ocorrência de endogamia na população acarretando no aumento da frequência de indivíduos homozigotos na progênie. A resolução de géis corados com nitrato de prata, pode ter dificultado a genotipagem de indivíduos heterozigotos com alelos separados por apenas 2

pares de bases que na análise feita de forma conservativa, podem ter sido considerados como homozigotos.

Os resultados sobre o sistema de cruzamento de *C. villosum* reforçam a idéia de que a reprodução da planta está intimamente relacionada com o comportamento do polinizador e como este é afetado pelo ambiente. A árvore da Reserva Ducke onde apenas marsupiais foram observados visitando as flores (presente estudo, Capítulo 1), apresentavam progênie resultante de autofecundação ou de cruzamento com árvores vizinhas e geneticamente aparentadas. Essa carência de polinizadores de grandes distâncias e a limitada movimentação de *Caluromys* sp. (JANSON *et al.* 1981, CARTHEW e GOLDINGAY 1997) talvez expliquem o fato de que três dos cinco cruzamentos são filhos da matriz com a planta mais próxima. Os 73 metros que separam as duas plantas, são menos expressivos, se for considerado que a copa de *C. villosum* é ampla, reduzindo a distância entre os ramos floridos dos indivíduos. Neste trabalho não foi encontrada uma explicação plausível para a ausência de morcegos visitando flores de *C. villosum* na Reserva Ducke.

A análise dos genótipos dos indivíduos próximos à matriz da Reserva Florestal Ducke revelou que nos nove hectares mapeados todas as plantas são indivíduos geneticamente similares, o que pode ser um reflexo da dificuldade de dispersão das sementes dessa espécie que, apesar de apreciadas pelas populações animais, são grandes (aproximadamente 53g - ALENCAR e MAGALHÃES 1979), bem protegidos por uma carapaça lenhosa e coberta por espinhos. Essa baixa dispersão atua como uma restrição no fluxo gênico como foi discutido por Collevatti *et al.* (2001) para *Caryocar brasiliense*, uma espécie comum nos cerrados do Brasil Central.

A consequência da dispersão de sementes limitada seria o estabelecimento de populações muito estruturadas geneticamente, o que ressalta a importância de polinizadores de longa distância, como morcegos, para o aumento dos cruzamentos entre indivíduos não aparentados (ROUBIK 2000, GRIBEL *et al.* 1999). A endogamia bi-parental pode ser diluída também pela assincronia e não periodicidade da floração de plantas de *C. villosum*. O piquiá na área da reserva

Ducke ocorre na densidade de 0,7 indivíduos por ha (R.L. MARTINS dados não publicados), porém o efeito da assincronia seria o mesmo de reduzir o tamanho efetivo da população, aumentando a distância dos cruzamentos (BAWA 1977, CHASE *et al.* 1996a, NAGAMITSU *et al.* 2001). As progênies resultantes de cruzamentos entre indivíduos geneticamente próximos estão também sujeitas às mesmas conseqüências de depressão por endogamia que as progênies originadas de autofecundação, ou seja, a manifestação da carga genética com a diminuição de vigor e fertilidade (HAMRICK e NASON 2000).

A restrição ao fluxo de genes pela baixa dispersão de frutos acentua-se em fragmentos onde dispersores estão confinados ou são inexistentes (KEARNS *et al.* 1998). As autofecundações na progênie da planta 1202, localizada no fragmento de 10 ha, podem ser resultantes da polinização por marsupiais arborícolas ou do forrageamento restrito dos morcegos que freqüentaram o fragmento, o que diminuiria a taxa de cruzamento. A baixa taxa de cruzamento entre plantas de fragmentos e o baixo fluxo de sementes podem ter conseqüências graves para as populações dos fragmentos, pois os cruzamentos "consangüíneos" podem causar uma diminuição na produção de frutos pela expressão de alelos deletérios recessivos e ocasionar a perda de variações genéticas adaptativas (NASON *et al.* 1998). Em sucessivas gerações, pode ocorrer diminuição da variação genética em fragmentos distantes geneticamente de outros fragmentos devido à deriva genética (COLLEVATTI *et al.* 2001; NASON *et al.* 1997).

Estudos de estrutura de populações como o de Loveless *et al.* (1998) atribuem o fluxo de genes de espécies de plantas com dispersão de sementes limitada, ao movimento promovido pelos polinizadores. Os cruzamentos com plantas que estão fora do fragmento tendem a diluir os efeitos do isolamento genético como diferenciação entre populações. Com a rápida fragmentação do ambiente Amazônico a tendência é o estabelecimento de grupos parentais em fragmentos que permutarão genes com indivíduos localizados em fragmentos mais próximos desde que a distância entre eles não ultrapasse o tamanho crítico mínimo necessário para suportar a população de polinizadores (NASON *et al.* 1998).

A entrada de pólen externo no fragmento onde se localiza a planta 1202 demonstra a capacidade do polinizador de promover cruzamentos entre plantas separadas até 600m. Esse deve ser o resultado da visitação de morcegos que, apesar da baixa presença demonstrada pela produção de sementes de auto-polinização, tem um importante papel na manutenção da variabilidade genética da progênie gerada dentro do fragmento. A presença de morcegos *Phyllostomus* spp. (presente estudo, Capítulo1), capazes de percorrer grandes distâncias (> 1km - Heithaus *et al.* 1975) corroboram a afirmação de que as populações de *C. villosum* cobrem grandes áreas e podem ser resilientes à fragmentação. Chase *et al.* (1996a) utilizando microssatélites, encontrou uma distância de cruzamento máximo de 350 metros para mariposas, enquanto Dick (2001) registrou distâncias que variam de 128 a 3200m entre plantas de *Dinizia excelsa* polinizadas por abelhas, mostrando que essa resistência à fragmentação está bem relacionada ao tipo de polinizador que frequenta a planta.

O número mínimo de pais observados, responsáveis pelas progênies revela a capacidade que os morcegos possuem de promover cruzamentos com muitas plantas e não somente com a planta mais próxima. Esse dado é mais uma evidência de que *C. villosum* é uma planta visitada por animais que cobrem longas distâncias (DOW e ASHLEY 1996) e que frequentam várias plantas doadoras de pólen. Surpreendentemente, a taxa de cruzamento em ambiente urbano mantém-se alta quando comparada com a planta de mata contínua da reserva Ducke. Isto pode ser explicado pela ocorrência de fragmentos florestais remanescentes dentro da cidade, a presença de *P. discolor* e glossofagíneos nestas áreas e a dificuldade das populações de marsupiais arborícolas se deslocarem nesse ambiente em mosaico.

Caryocar villosum parece ser uma espécie predominantemente alógama, mas com um potencial de endogamia que não pode ser negligenciado. A adoção de um sistema de cruzamento mais flexível, com utilização de uma estrutura floral "aberta" e elevada quantidade de recursos para atração de diferentes polinizadores (Capítulo1) pode conferir à espécie uma vantagem adaptativa por não depender de flutuações das populações de uma determinada espécie de

polinizador nas diferentes áreas de ocorrência. Um sistema de cruzamento com certo grau de autogamia é comum a outras plantas de ambientes em que a presença do polinizador é incerta (CRUDEN 1977). Nas árvores de *C. villosum* aqui estudadas não foi encontrada nenhuma relação clara do efeito direto da fragmentação ou qualquer outra modificação antrópica na taxa de cruzamento.

Os resultados desse estudo sugerem que o sistema de cruzamento misto e a polinização por um amplo espectro de visitantes tornam *C. villosum* uma espécie resistente às alterações no ambiente que resultem na diminuição da densidade da espécie e/ou de seus polinizadores, porém as conseqüências genéticas da endogamia (como por exemplo diminuição da variabilidade genética da progênie) provavelmente só poderão ser evitadas pela presença de polinizadores de longas distâncias.

CONCLUSÕES

- 1) *C. villosum* é uma planta que tipicamente exibe a síndrome de quiropterofilia com uma disposição das anteras em forma de bola de estames ou pincel, comum a plantas com flores visitadas por morcegos grandes.
- 2) Devido a sua estrutura floral aberta, o acesso ao néctar é facilitado a vários tipos de visitantes florais. Os visitantes mais comuns são morcegos que pousam nas flores (*Phyllostomus discolor*), morcegos de vôo adejado (glossofagíneo), mariposas esfingídeos e marsupiais.
- 3) A estruturação floral polifilica que confere à planta a capacidade de se adaptar a várias áreas e a vários tipos de polinizadores pode conferir a espécie vantagens adaptativas, não dependendo especificamente de um determinado polinizador para se reproduzir.
- 4) *C. villosum* é uma espécie com um certo grau de autocompatibilidade com indícios de que o pólen xenógamo tenha prevalência sobre o próprio pólen na fecundação da oosfera.
- 5) O sistema de cruzamento misto e a possibilidade de ser polinizada por muitos visitantes conferem uma certa resistência a alterações no ambiente como fragmentação e urbanização. Porém as conseqüências genéticas de endogamia (como por exemplo diminuição da variabilidade genética da progênie) só podem ser aliviadas pela presença de polinizadores de longas distâncias.
- 6) Não foi encontrado um padrão claro em relação à influencia do habitat na diversidade genética da progênie e na taxa de cruzamento, que parece estar mais diretamente relacionada à presença de polinizadores de longa distância como morcegos e mariposas.
- 7) Os marcadores microsatélites se mostraram como eficientes ferramentas para utilização em estudos de fluxo gênico e sistema de cruzamento de *C. villosum*, contribuindo para um melhor entendimento das estratégias de reprodução dessa espécie florestal e complementando as técnicas clássicas aplicadas em estudos de ecologia da polinização.

Anexo A:
Tabelas e Figuras do Capítulo 1

TABELA 1. Resultado dos testes de polinização controlada nas flores de *Caryocar villosum*.

Tratamento	Número de flores	Número de frutos	Sucesso em %
Auto-polinização	29	2	6,9
Polinização cruzada	27	4	14,8
Polinização aberta (controle)	33	1	3,0
Polinização aberta (flores com antese incompleta)	17	0	0

TABELA 2. Características morfológicas das flores e inflorescências de *C. villosum*.

Estrutura	Dimensões Intervalo	Quantidade \pm dp	Coloração
pedúnculo da inflorescência	13 – 24 cm (n=12)	–	verde
botões/ inflorescência	–	25 \pm 4 (n=12)	verde
comprimento da sépala	8,5 – 15,1 mm (n=6)	5 \pm 0 (n=6)	verde-amarelado
comprimento da pétala	20,8-32,7 mm (n=4)	5 \pm 0 (n=4)	amarelo-claro esbranquiçada
comprimento do estame	58-77 mm (n=5)	234 \pm 20 (n=5)	branco–amarelado
comprimento do estaminódio	20-33 mm (n=5)	41 \pm 5 (n=5)	branco–amarelado
comprimento do estilete	72- 81 mm (n=3)	4 \pm 0 (n=3)	verde-claro esbranquiçado
altura do ovário	4,4– 5,4 mm (n=4)	1 \pm 0 (n=3)	verde-claro
diâmetro do pólen do estame	57,8 – 81,5 μ (n=25)	411,3 \pm 115,6 (n = 15)	amarelo
diâmetro do pólen do estaminódio	59,0 – 76,5 μ (n=25)	195,7 \pm 79,5 (n = 15)	amarelo
diâmetro da superfície estigmática	535 – 545 μ (n=3)	4 \pm 0 (n=3)	–



FIGURA 1. Inflorescência de *C. villosum* com flores e botões.

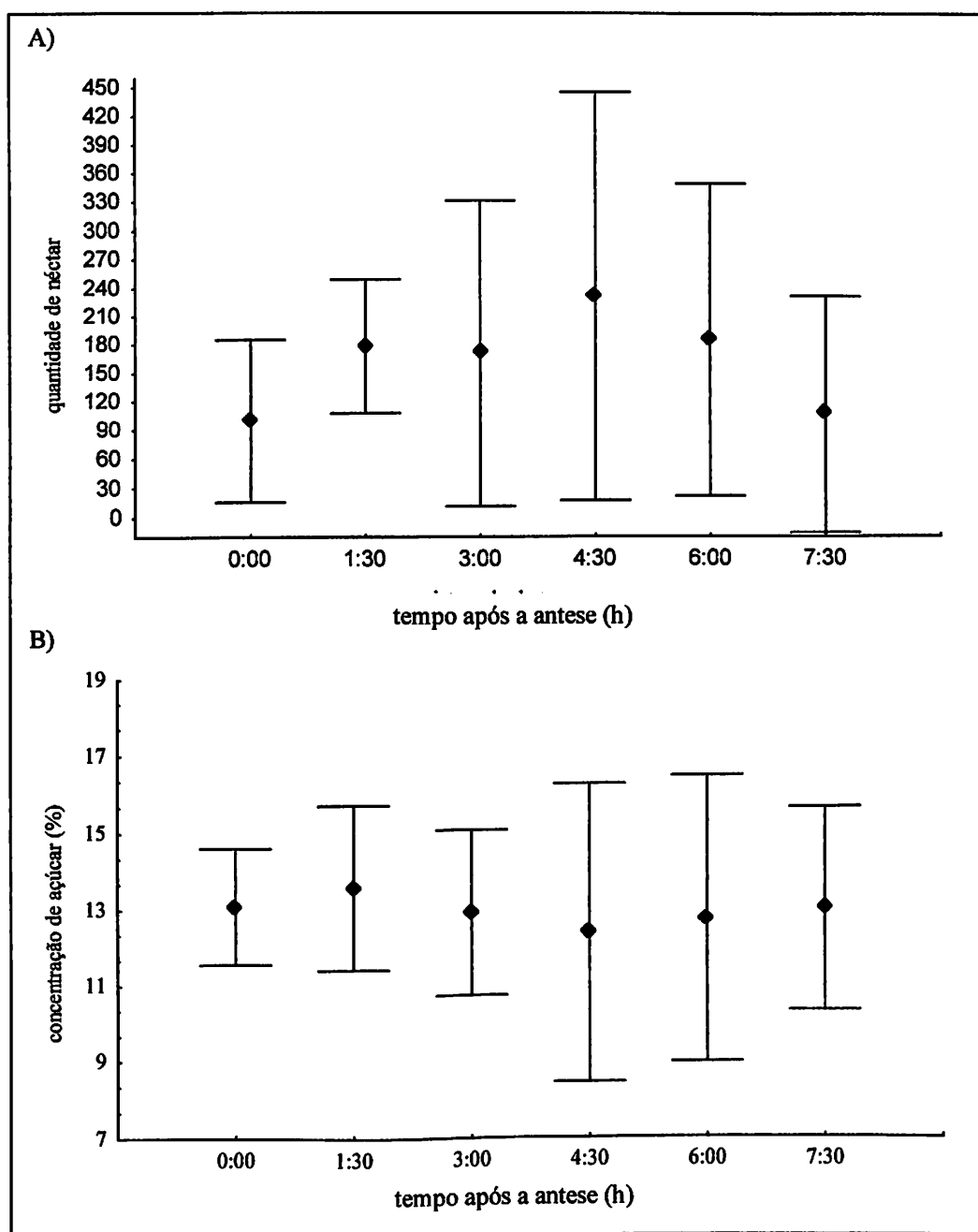


FIGURA 2. A) Volume de néctar produzido por flor ($n = 15$). B) Variação na concentração de açúcar ao longo do período em que a flor de *C.villosum* está aberta ($n = 15$). As barras verticais representam o desvio padrão.



FIGURA 3. Visita de *Phyllostomus discolor* na flor de *C. villosum*. Note que o morcego pousa sobre a inflorescência e o pólen está depositado na superfície ventral da asa do animal.



FIGURA 4. Visita de morcego glossofagíneo na flor de *C. villosum*. Note que devido ao vôo adejado o morcego não pousa na inflorescência, tocando apenas a flor que está sendo visitada.



FIGURA 5. Visita de Sphingidae na flor de *C. villosum*.

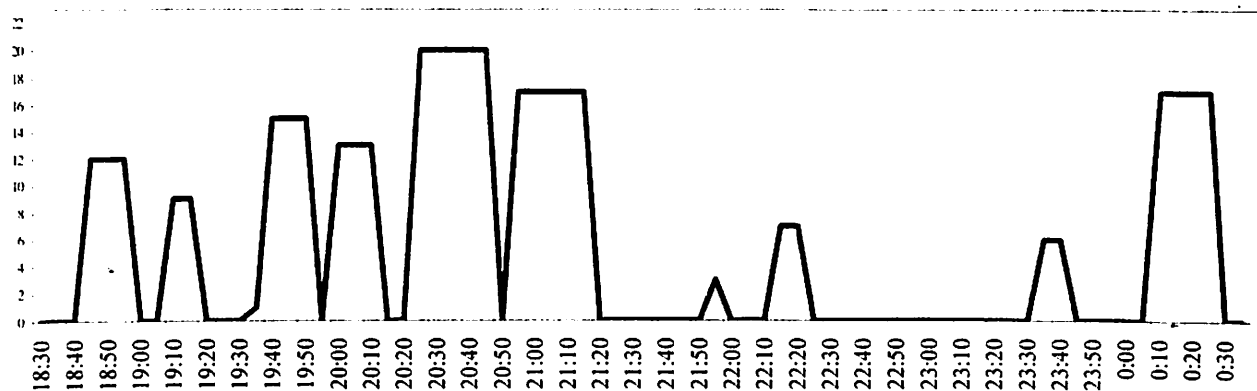


FIGURA 6. Tempo de duração por horário aproximado das ondas de forrageamento (em minutos) do grupo de *P. discolor* em uma planta de *C. villosum*, setembro de 2001.

Anexo B:
Tabelas e Figuras do Capítulo 2

TABELA 1. Características dos locos microssatélites analisados em *C. villosum*.

Loco	A	He	Ho	Q
cb1	8	0,88	0,40	0,6868
cb3	9	0,86	0,50	0,6671
cb5	6	0,68	0,70	0,4561
cb6	9	0,86	0,60	0,6671
cb9	6	0,84	0,30	0,6234
cb11	9	0,89	0,40	0,7065
cb12	7	0,69	0,50	0,4674
cb20	9	0,90	0,70	0,7308
cb23	8	0,88	0,40	0,6868
Média	7,9	0,79	0,50	*0,9855

A: número total de alelos

He: heterozigosidade esperada

Ho: heterozigosidade observada

Q: probabilidade de exclusão de paternidade

* obtido pela combinação dos valores da probabilidade de exclusão de cada loco.

TABELA 2: Genótipo de sete indivíduos adultos de *C. villosum* na Reserva Ducke. Tamanho dos alelos em pares de bases. Os valores entre parênteses se referem a distância das árvores em relação a matriz. Os indivíduos # 1, # 2, # 3, e # 4 localizam-se dentro a área de 9 hectares mapeada. Os indivíduos # 5 e # 6 se encontram fora da área mapeada.

# Loco	matriz	# 1 (73m)	# 2 (125m)	# 3 (148m)	# 4 (193m)	# 5 (284m)	# 6 (400m)
cb 20	140	158	158	158	140	170	140
	140	140	140	140	140	158	140
cb 23	160	156	000	160	160	152	150
	156	146	000	152	152	146	146
cb1	178	178	178	178	178	178	172
	178	178	178	178	178	178	172
cb11	158	158	158	158	158	148	150
	146	156	136	158	158	148	136
cb12	168	176	180	188	176	179	168
	158	158	158	158	168	158	158
cb3	142	142	142	142	148	142	132
	132	138	128	132	132	142	126
cb5	149	145	145	155	135	149	145
	135	135	135	135	135	139	139
cb6	120	118	118	128	104	120	118
	108	104	104	104	104	114	114

TABELA 3. Resultado da análise das cinco progênes de *C. villosum*, apresentando para cada uma: quantidade de sementes utilizadas na análise, número de locos analisados, número médio de alelos nos locos, média das heterozigosidades esperadas obtidas na análise dos locos, número mínimo de pais (doadores de pólen) da progênie genotipada, porcentagem de sementes resultantes de cruzamentos e fluxo de pólen detectado em algumas progênes.

família	habitat	nº de sementes	nº de locos	alelos/loco (média)+	<i>He</i> (média)+	nº mínimo de pais *	% de cruzamentos	fluxo de pólen
ZF-03	mata contínua	12	9	5,20	0,61	3	100%	?
1103	mata contínua	11	5	5,60	0,61	3	100%	?
1202	fragmento 10ha	11	9	4,80	0,59	3	63,63%	≥ 600 m
INPA	area urbana	9	9	4,20	0,56	3	100%	?
Ducke	mata contínua	12	8	2,60	0,39	2	41,66%	150 m
Total		55	-	-	-	-	80%	-

* Não foi considerado como doador de pólen a própria árvore mãe, quando auto-fecundada.

+ Foi considerado apenas os locos cb1, cb3, cb6, cb11 e cb20

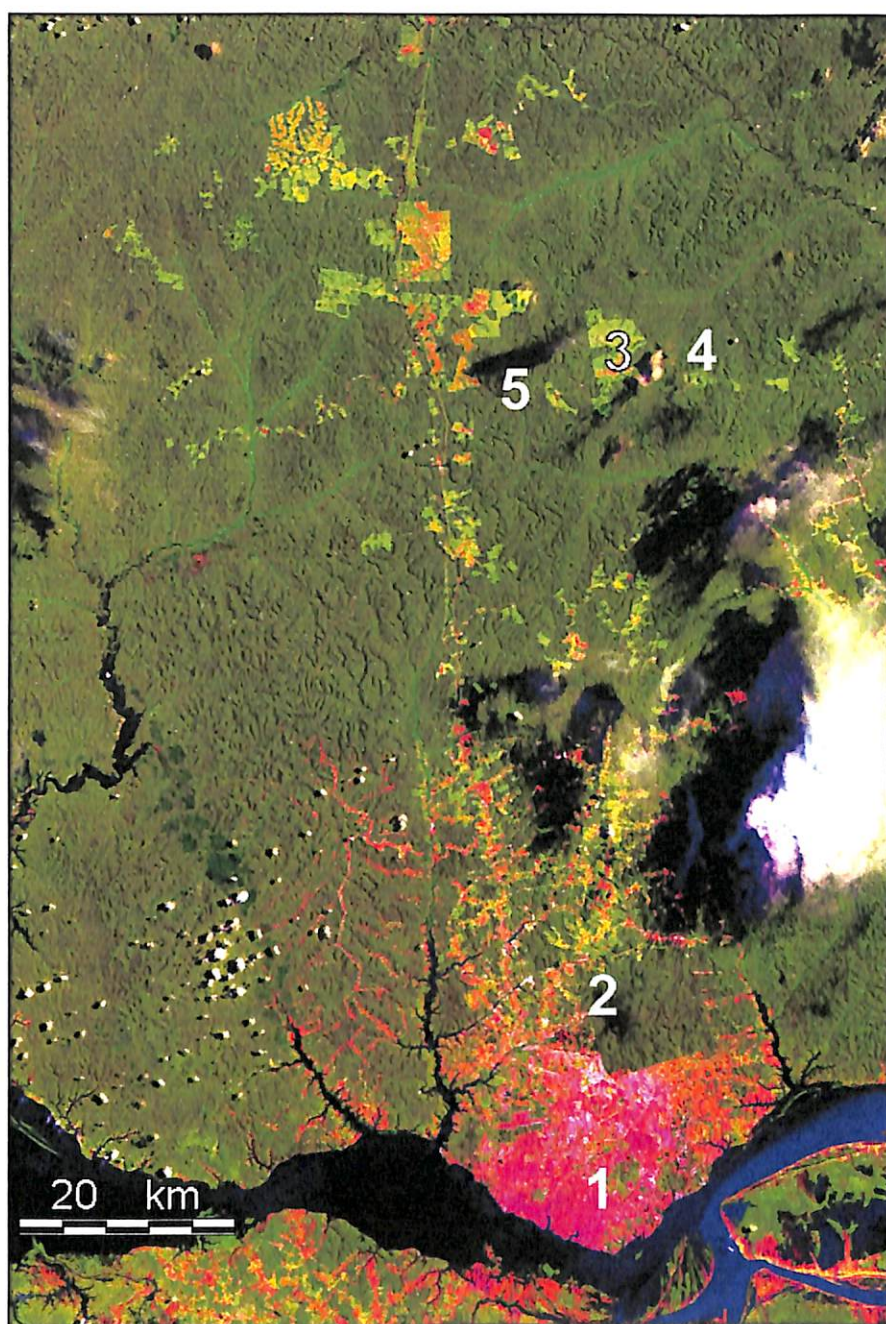


FIGURA 1. Imagem de satélite do município de Manaus – AM. Localização aproximada dos indivíduos: INPA (1), Ducke (2), 1202 (3), 1103 (4) e ZF-3 (5). Fonte: Landsat5, cena 231-062 - 990915, INPE-IPAAM.

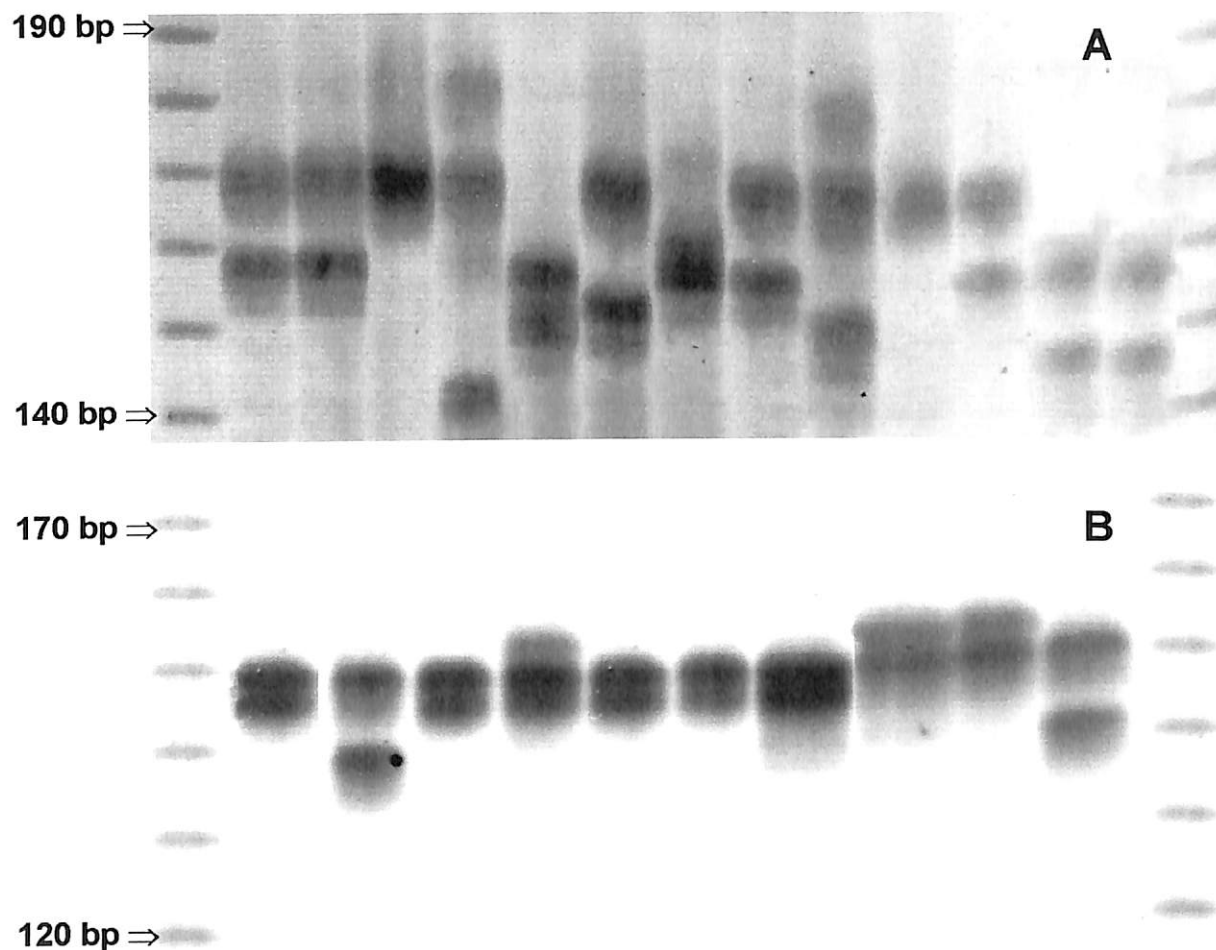


FIGURA 2. Parentesco e segregação em duas famílias de meio irmãos de *Caryocar villosum*, oriundos de polinização aberta, visualizado em gel denaturante de poliacrilamida corado com nitrato de prata. A) Família 1202, loco cb20, na primeira linha está o marcador de 10 bp (Gibco, MD), na segunda linha a matriz (genótipo 170/158) seguida dos 12 filhos (genótipos: 170/158, 170/170, 170/144, 158/150, 170/154, 162/158, 170/158, 170/150, 170/170, 170/158, 158/148, 158/148). B) Família INPA, loco cb05, na primeira linha está o marcador de 10 bp (Gibco, MD), na segunda linha a matriz (genótipo 149/149) seguida dos 9 filhos (genótipos: 149/139, 149/149, 153/149, 149/149, 149/149, 149/149, 153/149, 153/149, 149/131).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldrich, P. R.; Hamrick, J. L.; Chavarriaga, P.; Kochert, G. 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology*, 7: 933-944.
- Alencar, J.C.; Magalhães, L.M.S. 1979. Poder germinativo de sementes de doze espécies florestais da região de Manaus. *Acta Amazonica*, 9(3): 411-418.
- Araújo, F.D. 1995. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) – an economically valuable species of the Central Brazilian Cerrados. *Economic Botany*, 49(1): 40-48.
- Baker, H.G. 1960. The adaptation of flowering plants to nocturnal and crepuscular pollinations. *Quart. Rev. Biol.*, 36: 64 –73.
- Baker, H.G. 1975. Sugar concentrations in nectars from hummingbirds flowers. *Biotropica*, 7 (1): 37-41.
- Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G.; Gresshoff, P. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196: 80-83.
- Bawa, K. S. 1977. The reproductive biology of *Cupania guatemalensis* Radlk. (Sapindaceae). *Evolution*, 31:52-63.
- Bawa, K.S. 1990. Plant-Pollinator interactions, sexual systems and pollen flow - commentary. In: *International Workshop - Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants*. Bangi, Malásia. p.65-68.

- Brondani, R. P. V.; Brondani, C.; Tarchini, R.; Grattapaglia, D. 1998. Development, characterisation and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor. Appl. Genet.* 97: 816-827.
- Bullock, S.H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest. *Biotropica*, 17: 287-301.
- Cavalcante, P. B. 1988. *Frutas Comestíveis da Amazônia*. ed. 4. Museu Paraense Emílio Goeldi/ Companhia Souza Cruz Indústria e Comércio, Belém, Pará. 279p.
- Carthew, S.M.; Goldingay, R.L. 1997. Non-flying mammals as pollinators. *Tree*, 12 (3): 104-108.
- Chase, M. R.; Kessell, R.; Bawa, K. 1996a. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *American Journal of Botany*, 83 (1): 51-57.
- Chase, M. R.; Moller, R.C.; Kessell, R.; Bawa, K. 1996b. Distant gene flow in tropical trees. *Nature*, 383(3): 398-399.
- Collevatti, R. G.; Brondani, R.V.; Grattapaglia, D. 1999. Development and characterisation of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. *Heredity*, 83 (6): 748-756.
- Collevatti, R.G.; Grattapaglia, D.B.; Hay, J.D. 2001. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. *Heredity*, 86 (1): 60-67.
- Condit, R.; Hubbell, S. P. 1991. Abundance and DNA sequence of 2-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome*, 34: 66-71.

- Cruden, R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 31: 32-46.
- Cruzan, M.B. 1998. Genetic Markers in plant evolutionary ecology. *Ecology*, 79(2):400-412.
- Dayanandan, S.; Bawa, K. S.; Kesseli, R. 1997. Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 84: 1658-1663.
- Dayanandan, S.; Dole, J.; Bawa, K.; Kesseli, R. 1999. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Molecular Ecology*, 8(10): 1585-1592.
- Dick, C.W.; Hamilton, M. B. 1999. Microsatellites from the Amazonian tree *Dinizia excelsa* (Fabaceae). *Molecular Ecology*, 8(10): 1765.
- Dick, C.W. 2001. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. *Proc. Royal Society of London B.*, 268: 2391-2396.
- Dow, B.D.; Ashley, M.V. 1996. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology*, 5: 615-627.
- Elmqvist, T.; Cox, P.A.; Rainey, W.E.; Pierson E.D. 1992. Restricted pollination on oceanic islands: Pollination of *Ceiba pentandra* by flying foxes in Samoa. *Biotropica*, 24 (1):15-23.
- Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de Marcadores Moleculares*. ed. 3. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília. 220 p.

- Gibbs, P. E., Oliveira, P.E.; Bianchi, M.B. 1999. Postzygotic control of selfing in *Hymenaea stignocarpa* (Leguminosae – Caesalpinioideae), a bat-pollinated tree of the Brazilian cerrados. *International Journal of Plant Science*, 160 (1): 72-78.
- Gribel, R. 1988. Visits of *Caluromys lanatus* (Didelphidae) to flowers of *Pseudobombax tomentosum* (Bombacaceae): a probable case of pollination by marsupials in Central Brazil. *Biotropica*, 20 (4): 344-347.
- Gribel, R.; Hay, J.D. 1993. Pollination ecology of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) in Central Brazil cerrado vegetation. *Journal of Tropical Ecology*, 9: 199-211.
- Gribel, R.; Gibbs, P. E.; Queiróz, A. L. 1999. Flowering phenology and pollination biology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Amazonia. *Journal of Tropical Ecology*, 15: 247-263.
- Hamilton, M.B. 1999. Tropical tree gene flow and dispersal. *Nature*, 401: 129-130.
- Hamrick, J.L.; Godt, M. J. W.; Sherman-Broyles, S. L. 1995. Gene flow among populations: evidence from genetic markers. In : Hock, P.C.; Stephenson, A.G. (Eds). *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics*. Botanical Garden Press, St. Louis, USA. p.215 –232.
- Hamrick, J.L.; Nason, J.D. 2000. Gene flow in forest trees. In: Young, A., Boshier, D.; Boyle, T. (Eds). 2000. *Forest conservation genetics: Principles and Practice*. CSIRO Publishing/ CABI Publishing, Australia. 352 p.
- Harris, B.J.; Baker, H.G. 1959. Pollination of flower by bats in Ghana. *Nigerian Field*, 24:151-159.
- Heithaus, E. R.; Opler, P.A.; Baker, H.G. 1974. Bat activity and pollination of *Bauhinia pauletia*: plant-pollinator coevolution. *Ecology*, 55 (2): 412-419.

- Heithaus, E. R.; Fleming, T.H.; Opler, P.A. 1975. Foraging patterns and resource utilization in seven species of bats in a seasonal tropical forest. *Ecology*, 56: 841-854.
- Hokche, O.; Ramirez, N. 1990. Pollination ecology of seven species of *Bauhinia* L. (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 77: 559-572.
- James, T.; Vege, S.; Aldrich, P.; Hamrick, J.L. 1998. Mating Systems of three Tropical Dry Forest tree Species. *Biotropica*, 30 (4): 587-594.
- Janson, C. H., Terborgh, J.; Emmons, L.H. 1981. Non-flying mammals as pollinating agents in the amazonian forest. *Reproductive Botany suppl. to Biotropica*, 13: 1-6.
- Janzen, D.H. 1980. *Ecologia Vegetal nos Trópicos*. Editora Pedagógica Universitária, São Paulo. 79 p.
- Kageyama, P.Y. 1990. Genetic structure of tropical tree species of Brazil. In: *International Workshop - Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants*. Bangi, Malásia. p.29-35.
- Kearns, C. A.; Inouye, D.W. 1993. *Techniques for Pollination Biologists*. University Press of Colorado, Niwot, USA. 250 p.
- Kearns C.A.; Inouye, D.W.; Waser, N.M. 1998. Endangered mutualism: The conservation of plant-pollinator interaction. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 83-112.
- Kijas, J. M. H.; Fowler, J. C. S.; Thomas, M. R. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome*, 38: 349-355.

- Küchmeister, H.; Silberbauer-Gottsberger, I.; Gottsberger, G. 1997. Flowering, pollination, nectar standing crop, and nectaries of *Euterpe precatoria* (Arecaceae), an Amazonian rain forest palm. *Pl. Syst. Evol.*, 206: 71-97.
- Lanaud, C.; Risterucci, A.M.; Pieretti, I.; Falque, M.; Bouet, A.; Lagoda, P.J.L. 1999. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Molecular ecology*, 8 (12): 2141-2142.
- Laurance, W.F.; Vasconcelos H.L. 2000. Amazônia: conseqüências das mudanças climáticas e de uso da terra para a floresta. *Ciência Hoje*, 27: 59 –62.
- Lemes, M. R. 2000. Population genetic structure and mating system of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) in the Brazilian Amazon: Implications for conservation. Ph.D. thesis, University of Stirling, UK.
- Lemes, M.R.; Brondani, R.P.V.; Grattapaglia, D. 2001. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis in mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened Neotropical timber species. *Journal of Heredity* (no prelo).
- Lemke, T.O. 1984. Foraging ecology of the long-nosed bat, *Glossophaga soricina*, with respect to resource availability. *Ecology*, 65 (2): 538-348
- Loveless, M. D. 1992. Isozyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization. *New Forest*, 6: 67-94.
- Loveless, M. D.; Hamrick, J.L.; Foster, R.B. 1998. Population structure and mating system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. *Heredity*, 81: 134-143.

- Machado, A.O.; Oliveira, P.E.A.M. 2000. Biologia floral e reprodutiva de *Casearia grandiflora* Camb. (Flacourtiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 23 (3): 283-290.
- Marques Filho, A. O.; Ribeiro, M. N.G.; Santos, H.M.; Santos, J.M. 1981. Estudos Climatológicos da Reserva Florestal Ducke – Manaus – AM. IV. Precipitação. *Acta Amazonica*, 11:759-768.
- Miwa, M.; Tanaka, R.; Shinone, M.; Kojima, K.; Hogetsu, T. 2000. Development of polymorphic microsatellite markers in a tropical tree species, *Melaleuca cajuputi* (Myrtaceae). *Molecular Ecology*, 9(5): 639-640.
- Murawski, D. A.; Hamrick, J. L. 1992. Mating system and phenology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Panama. *Journal of Heredity*, 83: 401-404.
- Nagamitsu, T.; Ichikawa, S.; Ozawa, M.; Shimamura, R.; Kachi, N.; Tsumura, Y. Muhammad, N. 2001. Microsatellite analysis of the breeding system and seed dispersal in *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae). *International Journal of Plant Science*, 162 (1): 155-159.
- Nason, D.; Herre, E.A.; Hamrick, J.L. 1996. Paternity analysis of the breeding structure of strangler fig populations: evidence for substantial long-distance wasp dispersal. *Journal of Biogeography*, 23: 501-512.
- Nason, D.; Aldrich, P. R.; Hamrick, J.L. 1997. Dispersal and the dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree population. In: Laurance W.F.; Bierregaard, R.O., Jr. *Tropical Forest Remnants*. Universit of Chicago Press Press, USA. p.304 –320.
- Nason, D.; Herre, E.A.; Hamrick, J.L. 1998. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. *Nature*, 391: 685-687.

- Newton, A. C.; Allnutt, T.C.; Gillies, A. C. M.; Jowe, A.J.; Ennos, R. A. 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Tree*, 14 (4): 140–145.
- Paetkau, D.; Calvert, W.; Stirling, I.; Strobek, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347-354.
- Prance, G.T. 1990. The genus *Caryocar* L. (Caryocaraceae): an underexploited tropical resource. *Advances in Economic Botany*, 8: 177-188.
- Prance, G.T.; Silva, M.F. 1973. Caryocaraceae. *Flora Neotropica*, 12: 1-75.
- Raymond, M.; Rousset, F. 1998. GENEPOP (version 3.1c) an updated version of GENEPOP V.1.2 (1995): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- Rocha, I.R.D.; Morais, H.C.; Kitayama, K. 1991. Visitantes diurnos de flores quiropterófilas. *Revista Brasileira de Biologia*, 51 (1): 249-256.
- Rodriguez, H.; Geistlinger, J.; Berlyn, G.; Kahl, G.; Weising, K. 2000. Characterisation of novel microsatellite loci isolated from the tropical dioecious tree *Simarouba amara*. *Molecular Ecology*, 9(4): 498-500.
- Rosseto, M.; Slade, R. W.; Baverstock, P. R.; Henry, R. J.; Lee, L. S. 1999. Microsatellite variation and assessment of genetic structure in tea tree (*Melaleuca alternifolia* – Myrtaceae). *Molecular Ecology*, 8(4): 633-643.
- Roubik, D. W. 2000. Pollination system stability in tropical America. *Conservation biology*, 14 (5): 1235-1236.

- Ribeiro, J. E. L. S.; Hopkins, M.J.G.; Vicentine, A.; Sothers, C.A.; Costa, M.A.S.; Brito, J.M.; Souza, M.A.D.; Martins, L.H.P.; Lohmann, L.G.; Assunção, P.A.C.L.; Pereira, E.C.; Silva, C.F.; Mesquita, M.R.; Procópio, L.C. 1999. *Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra Firme na Amazônia Central*. INPA, Manaus, Amazonas. 816 p.
- Sazima, I.; Sazima M. 1977 Solitary and group foraging: two flower-visiting patterns of the lesser spear-nosed bat *Phyllostomus discolor*. *Biotropica*, 9 (3): 213-215.
- Sazima, M.; Sazima I. 1978 Bat pollination of the passion flower, *Passiflora mucronata* in Southeastern Brazil. *Biotropica*, 10 (2): 100-109.
- Sazima, M.; Sazima I. 1980 Bat visits *Marcgravia myriostigma* Tr. et Planch. (Marcgraviaceae) in Southeastern Brazil. *Flora*, 169: 84-88.
- Scariot, A. 1999. Forest fragmentation effects on palm diversity in central Amazonia. *Journal of Ecology*, 87: 66-76.
- Silvertow, J. W.; Doust, J. L. 1993. *Introduction to Plant Population Biology*. Blackwell Scientific Publication, Washington, USA. p.36-42.
- Stacy, E.A.; Hamrick, J.L.; Nason, J.D.; Hubbell, S.P.; Foster, R.B.; Condit, R. 1996. Pollen dispersal in low-density populations of three neotropical tree species. *The American Naturalist*, 48(2): 275-298.
- Timm, R. M.; LaVal R. K. 1998. A field key to the bats of Costa Rica. *Ocasional Publication Series - Center of Latin American Studies*, 22: 1-30.
- Ujino, T.; Kawahara, T.; Tsumura, Y.; Nagamitsu, T.; Yoshimaru, H.; Ratnam, W. 1998. Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA

markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species. *Heredity*, 81: 422-428.

Vastano, B.J.T.; Barbosa, A.P. 1983. Propagação vegetativa do piquiá (*Caryocar villosum* Pers.) por estaquia. *Acta Amazonica*, 13 (1):143-148.

Vogel, S. 1968. Chiropterophilie in der Neotropischen Flora. Neue Mitteilungen I. *Flora Abteilung B* 1578: 562-602.

White, G. M.; Powell, W. 1997a. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. *Molecular Ecology*, 6: 851-860.

White, G. M.; Powell, W. 1997b. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. *Molecular Ecology*, 6: 1195-1197.

Weir, B.S. 1996 *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. ed. 2. Sinauer Associates/ Inc. Publishers, Canada. 445 p.

Willing, M.R. 1983. Composition, Microgeographic variation, and dimorphism in caatingas and cerrado bat communities from north-east Brazil. *Bulletin of the Carnegie Museum of Natural History*, 23: 1-131.