

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

ANA CAROLINA GALINDO DA COSTA

**ATRIBUTOS FLORAIS E TRANSIÇÃO ENTRE POLINIZAÇÃO ABIÓTICA E
BIÓTICA EM ESPÉCIES DE *Rhynchospora* VAHL (CYPERACEAE)**

Recife

2017

ANA CAROLINA GALINDO DA COSTA

**ATRIBUTOS FLORAIS E TRANSIÇÃO ENTRE POLINIZAÇÃO ABIÓTICA E
BIÓTICA EM ESPÉCIES DE *Rhynchospora* VAHL (CYPERACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Área de Concentração Ecologia Vegetal, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Machado

Coorientador: Dr. William Wayt Thomas

Recife

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Costa, Ana Carolina Galindo da

Atributos florais e transição entre polinização abiótica e biótica em espécies de *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). / Recife: O Autor, 2017.

145 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Isabel Cristina Machado

Coorientador: William Wayt Thomas

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Vegetal, 2017.

Inclui referências e anexo

- 1. Fertilização de plantas 2. Cyperaceae 3. Adaptação (fisiologia)
I. Machado, Isabel Cristina (orient.) II. Thomas, William Wayt (coorient.) III. Título**

571.8642

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 487

ANA CAROLINA GALINDO DA COSTA

**ATRIBUTOS FLORAIS E TRANSIÇÃO ENTRE POLINIZAÇÃO ABIÓTICA E
BIÓTICA EM ESPÉCIES DE *Rhynchospora* VAHL (CYPERACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Área de Concentração Ecologia Vegetal, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Biologia Vegetal.

APROVADA EM: 22/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. ISABEL CRISTINA SOBREIRA MACHADO (Orientadora) - UFPE

Dr. ANDRE RODRIGO RECH (Titular externo) - UFVJM

Dr. ARTUR MAIA WANDERLEY (Titular externo) - UFPE – *campus* Vitória

Dra. ARIADNA VALENTINA LOPES (Titular interno)-UFPE

Dra. ANDREA PEDROSA HARAND (Titular interno) - UFPE

*Aos meus pais, José e Sônia, à minha irmã, Alice e ao
meu amor, Tasso que sempre estiveram do meu lado,
dedico*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que durante mais uma etapa da minha vida me ajudaram, me ensinaram e me acompanharam e em especial,

À minha orientadora, Dr^a Isabel Cristina Machado, pela dedicação e carinho durante 10 anos de formação acadêmica, por me ensinar a fazer ciência, pela alegria de ouvir cada descoberta e me mostrar o valor delas, por me inspirar e ser meu maior exemplo de orientadora e pesquisadora, por sempre acreditar em mim, por todas as oportunidades.

Ao meu coorientador, Dr. William Wayt Thomas, por estar presente, mesmo quando distante fisicamente, em todas as etapas desta tese, pelo carinho e incentivo, pela oportunidade de pesquisar no NYBG, por me ensinar a entender e apreciar cada vez mais as ciperáceas.

À minha família, especialmente os meus pais José da Costa e Sônia Galindo, minha irmã Alice Galindo, meu cunhado Ítalo Azevedo, meus sogros Severino Brito e Penha Brito, e minhas cunhadas Camila Brito e Ana Katarina Brito, por todo carinho, por sempre me incentivarem.

Ao meu amor, Tásso Brito, pelo cuidado e carinho, por estar do meu lado em todos os momentos, por querer o melhor pra mim, mesmo que isso signifique estar distante, por comemorar cada conquista.

Aos meus amigos Elivania, Luana, Anderson, Cheila, Rafa, Manassés, Paulo, Nathália e Raissa, pelos momentos de descanso, por sempre me escutarem e estarem do meu lado, por saber que sempre posso contar com vocês.

À Danilo José, Aline Quaresma, Luciana Câmara, Paula Zama, Alexandre Almeida, Thaís Santos, Julia Beneti, Cíntia Luz e Norma Dhanaraj por tornarem os nove meses em Nova York ainda mais especiais e divertidos, por todas as aventuras, por serem minha família lá.

À Patrícia Lima e Gabriela Cunto pela amizade, por toda ajuda nos trabalhos de campo, companhia e carona para Reserva Biológica de Guaribas.

Aos Integrantes do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva – Polinizar, pela amizade, por todas as conversas, pelo aprendizado e ajuda mútua, e em especial à Elivania Barral, pela amizade, por toda ajuda em todas as etapas da tese, auxílio em estatística, pelas discussões científicas, pela campanha de campo. À Sinzinando Lima, pela amizade, pelo bolo de chocolate, por toda ajuda e apoio em todos os momentos; e a Diego Sotero, pela amizade, pela leitura dos capítulos, sugestões e todo suporte para que o capítulo 5 estivesse pronto a tempo, por estar sempre disponível para ajudar.

À professora Dra. Anete Pedro Lourenço, por me aceitar como pesquisadora visitante na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, em Diamantina, Minas Gerais, e também à técnica de laboratório MSc. Daliana Fonseca, por cederem espaço na universidade para realização de parte da pesquisa em Diamantina e sempre me ajudarem em tudo que foi necessário.

À Reserva Biológica de Guaribas, em Mamanguape, ao Jardim Botânico de Recife e Parque Estadual Dois Irmãos, por permitir que parte da pesquisa fosse realizada na reserva, por todo suporte e apoio para que o estudo fosse realizado.

Ao New York Botanical Garden, à toda equipe de funcionários, por me aceitarem na instituição para realizar a pesquisa, por permitir o uso do laboratório e equipamentos necessário, pelo carinho e por me fazerem me sentir em casa.

À Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento e bolsa de pesquisa de Doutorado e pela bolsa de mobilidade discente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado sanduíche no Jardim Botânico de Nova York, nos Estados Unidos.

RESUMO

Anemofilia é uma condição plesiomófica na família Cyperaceae. Contudo, há registros de insetos visitando flores e atuando como polinizadores em espécies de alguns gêneros desta família, tais como *Rhynchospora* (Vahl.). O objetivo desta tese foi ampliar o conhecimento acerca do sistema de polinização de espécies de *Rhynchospora*, investigando morfológica e filogeneticamente os atributos relacionados à anemofilia, entomofilia e/ou ambos. Para isso, analisaram-se os diversos atributos florais e morfológicos em *Rhynchospora*, classificando as espécies em diferentes síndromes de polinização, testamos o papel das brácteas involucrais na atração de insetos e os efeitos ambientais ao longo do tempo e em diferentes localizações dos indivíduos na ação dos vetores de pólen. Além disso, os atributos florais de 79 espécies da tribo Rhynchosporae foram mapeados em uma reconstrução filogenética de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana para entender como estes caracteres surgiram, quais são plesiomórficos e quais são derivados no grupo. Verificamos que há um gradiente de atributos florais em espécies de *Rhynchospora* que nos permitem classificá-las em: anemófilas (5% das espécies estudadas), quando não há atrativos secundários; ambófilas (70%), quando há tanto atributos anemófilos quanto atrativos secundários; e entomófilas (25%) quando há apenas atrativos secundários. Foram registrados e analisados pela primeira vez odores emitidos pelas flores do gênero. No geral, as síndromes de polinização corresponderam aos sistemas de polinização. Dentre os atributos florais mais conspícuos do gênero, as espécies que possuem brácteas involucrais brancas atraem primeiro insetos do que aquelas com brácteas involucrais verdes, indicando que os insetos podem enxergá-las primeiro, havendo uma preferência. Contudo, espécies com brácteas involucrais verdes podem se beneficiar por ter população próxima a estas espécies mais conspícuas, sendo polinizadas por insetos quando o recurso destas acabam, sugerindo um possível processo de facilitação. Além disso, verificamos que a participação do vento e dos insetos em espécies ambófilas pode variar temporalmente e espacialmente, havendo maior participação do vento em períodos mais chuvosos e com alta velocidade de vento, e nos indivíduos localizados na borda da mata. Os insetos suprem a formação de frutos quando há menor precipitação e menor velocidade do vento. Além disso, os insetos são os principais vetores de pólen de indivíduos de *R. cephalotes* localizados dentro da mata. Portanto, sugerimos que a ambofilia é uma síndrome estável e importante para o sucesso reprodutivo do grupo. Atributos florais relacionados à anemofilia, como inflorescência do tipo panícula, brácteas involucrais verdes, brácteas florais marrons e estigma bifido são plesiomórficos no grupo. Já atributos

relacionados à entomofilia surgiram de forma independente nos quatro clados da tribo. A partir deste estudo obteve-se uma visão geral sobre a biologia floral e reprodutiva em espécies de *Rhynchospora*, pode-se entender melhor o papel dos vetores de pólen, a importância da ambofilia e a história evolutiva do surgimento de caracteres entomófilos. Além disso, esta tese quebra o paradigma de que *Rhynchospora* é um gênero anemófilo, sendo possível, a partir deste estudo, classificá-lo como ambófilo.

Palavras-chave: Ambofilia. Anemofilia. Cyperaceae. Entomofilia. Adaptação. Reconstrução ancestral de caracteres. *Rhynchospora*.

ABSTRACT

The anemophily is a plesiomorphic condition in the family Cyperaceae. However, there are records of insects visiting flowers and acting as pollinators in species of some genus of this family, such as *Rhynchospora* (Vahl.). The aim of this thesis was to increase the knowledge about the *Rhynchospora* species pollination system, investigating morphologically and phylogenetically the attributes related to anemophily, entomophily and/or both. For this, we analyzed the floral and morphological traits in *Rhynchospora*, classifying the species in different syndromes; also we tested the role of the involucre bracts in the attraction of insects. Moreover, we analyzed the environmental effects in the contribution of pollen vector to fruit set of ambophilous species of *Rhynchospora* over the time and in different locations of the individuals. In addition, floral traits of 79 species of the tribe Rhynchosporae were mapped onto a phylogenetic reconstruction of Maximum Likelihood and Bayesian Inference to understand how these characters appeared, as well as to trace the evolution of significant reproductive characters in the group. We verified that there was a gradient of floral traits in *Rhynchospora* that allowed us to classify them into anemophilous species (5% of species) when there were no secondary attractions; ambophilous (70%), when there were both anemophilous attributes and secondary attractions; and entomophilous (25%), when there were only secondary attractions. Scent emission in flowers of the genus was recorded and analyzed for the first time. In general, pollination syndromes correspond to pollination systems. Among the most conspicuous floral attributes of the genus, species that have white involucre bracts attracts insects first than those with green involucre bracts, indicating that insects can see them first, and prefer them. However, species with green involucre bracts may benefit from when their specimens are close to a population of these more conspicuous species, being pollinated by insects when the resource of species with white involucre bracts ends, being a possible facilitation process. We verified that the participation of the wind and the insects in ambophilous species can vary temporally, having greater participation of the wind in wet periods with high wind speed, and in the individuals located in the edge of the forest. Insects provide fruit formation when there is less rainfall and lower wind speeds. In addition, insects are the main pollen vectors of individuals of *R. cephalotes* located inside of the forest. Therefore, we suggest that amobophily is a stable pollination syndrome and important for the reproductive success of *Rhynchospora*. Floral attributes related to anemophily are plesiomorphic in the group. On the other hand, traits related to entomophily

appeared independently in the four clades of the tribe. From this study we have an overview of the floral and reproductive biology of *Rhynchospora* species; we can better understand the role of pollen vectors, the importance of ambophily and the evolutionary history of the appearance of entomophilous characters. This thesis breaks the paradigm that *Rhynchospora* is an anemophilous genus, and, from this study, we can classify it as ambophilous.

Key-Words: ancestral reconstruction of characters. Ambophily. Anemophily. Cyperaceae. Entomophily. Adaptation. *Rhynchospora*.

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1	Polinização abiótica.....	14
2.1.1	Anemofilia.....	14
2.1.2	Ambofilia	16
2.2	Adaptação à entomofilia em cyperaceae	17
2.3	Estudos filogenéticos em <i>rhynchospora</i>	18
3	GRADIENTE DE ATRIBUTOS FLORAIS EM <i>RHYNCHOSPORA</i> (CYPERACEAE): EVIDÊNCIAS DE AMBOFILIA E ENTOMOFILIA EM UMA FAMÍLIA ESSENCIALMENTE ANEMÓFILA.....	20
4	COMPARATIVE FLORAL BIOLOGY OF <i>RHYNCHOSPORA CILIATA</i> (VAHL) KUKENTH AND <i>R. PUBERA</i> (VAHL) BOECKELER (CYPERACEAE): THE ROLE OF WHITE INVOLUCRAL BRACTS IN ATTRACTING POLLINATING INSECTS.....	51
5	INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL VARIATION ON THE POLLINATION OF THE AMBOPHILOUS SEDGE <i>RHYNCHOSPORA CILIATA</i> (CYPERACEAE)	70
6	GANGORRA NA POLINIZAÇÃO DE <i>RHYNCHOSPORA CEPHALOTES</i> (L.) VAHL. (CYPERACEAE): INFLUÊNCIA DA LOCALIZAÇÃO DAS PLANTAS NO PAPEL DO VENTO E DE INSETOS COMO VETORES DE PÓLEN	94
7	RECONSTRUÇÃO ANCESTRAL DOS ATRIBUTOS FLORAIS E REPRODUTIVOS NA TRIBO RHYNCHOSPOREAE(CYPERACEAE): UMA ADAPTAÇÃO À ENTOMOFILIA?109	
8	CONCLUSÕES	136
	REFERENCIAS	137
	ANEXO – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NOS PERÍODICOS	141

1 APRESENTAÇÃO

Estudos de atributos florais e reprodutivos relacionados à transição entre sistemas de polinização, como da anemofilia para a entomofilia são essenciais para o entendimento de quais características podem estar associadas às mudanças necessárias para que haja essa transição, que possibilitam a atração de potenciais insetos polinizadores. Em Cyperaceae, família caracteristicamente anemófila, há alguns casos em que se infere que determinadas características, como anteras e brácteas involucrais coloridos, possam atrair insetos, porém poucos estudos trazem a evidência de que estes atributos efetivamente estejam sendo atrativos e quais vetores de pólen atuam em plantas com estas e outras características.

Neste estudo, utilizando o gênero *Rhynchospora* (Vahl), pertencente à família Cyperaceae, como modelo, analisamos atributos que estão relacionados a essa transição entre síndromes de polinização envolvendo vetores abióticos e bióticos, incluindo casos também de ambofilia, uma síndrome intermediária entre a anemofilia e entomofilia, em que ambos os tipos de vetores contribuem para o sucesso reprodutivo da espécie. Além disso, trazemos evidências da condição derivada de atrativos secundários, associados à adaptação à entomofilia, inclusive casos de espécies predominantemente entomófilas, comprovando que esta família não pode mais ser considerada como essencialmente anemófila.

Organizamos a Tese em uma fundamentação teórica, e cinco capítulos. Na fundamentação teórica abordamos aspectos gerais da polinização abiótica, mais especificamente da anemofilia e ambofilia. Trazemos o estado da arte sobre estudos de polinização em Cyperaceae e de adaptação à entomofilia e de reconstrução de estados ancestrais de caracteres relacionados à polinização em *Rhynchospora*.

No primeiro capítulo, intitulado “Gradiente de atributos florais em *Rhynchospora* (Cyperaceae): evidências de ambofilia e entomofilia em uma família essencialmente anemófila”, nós exploramos a grande diversidade de atributos florais e reprodutivos que podem ser encontrados no gênero *Rhynchospora*. Apontamos aqueles atributos que estão associados à anemofilia, à ambofilia e os que podem estar associados à entomofilia, tais como brácteas involucrais brancas e brácteas florais brancas ou amarelas. Além disso, fizemos o primeiro registro de emissão de odor floral incluindo dados da quantidade e composição dos compostos emitidos por algumas espécies de *Rhynchospora*. Discutimos como a presença desses atributos pode ser importante para a atração de insetos polinizadores e analisamos a visita e o comportamento deles em flores de algumas espécies. Além disso, indicamos a contribuição dos vetores de pólen, insetos e vento, para o sucesso reprodutivo de várias

espécies do gênero. Este estudo servirá como base e irá auxiliar futuras pesquisas sobre transição entre sistemas de polinização, particularmente sobre transição da anemofilia para a entomofilia em diversas famílias de Angiospermas. Este capítulo será enviado para publicação ao periódico *Annals of Botany* (Fator de impacto: 3.982; Qualis – A1).

O segundo capítulo, intitulado “Comparative floral biology of *Rhynchospora ciliata* (Vahl) Kuntze and *R. pubera* (Vahl) Boeckeler (Cyperaceae): the role of white involucral bracts in attracting pollinating insects”, traz um estudo experimental sobre a importância das brácteas involucreis brancas para a atração de abelhas. Fizemos uma comparação na quantidade de visitas de duas espécies simpátricas e com morfologia floral bastante semelhante, *Rhynchospora ciliata*, que possui brácteas florais brancas, e *Rhynchospora pubera*, que possui brácteas involucreis verdes. A partir deste estudo confirmamos que as brácteas involucreis brancas são importantes para a atração de insetos polinizadores e que *R. pubera* pode se beneficiar na atração de insetos por possuir população próxima à *R. ciliata*, sendo um possível caso de facilitação. Este artigo foi aceito para publicação no periódico *Plant Species Biology* (Fator de impacto: 1.303; Qualis – B2).

No terceiro capítulo, intitulado “Influence of environmental variation on the pollination of the ambophilous sedge *Rhynchospora ciliata* (Cyperaceae)”, analisamos em períodos secos e úmidos a influência de variáveis ambientais, tais como precipitação, umidade, temperatura e velocidade do vento na ação dos vetores de pólen para a formação de frutos pelos vetores bióticos e abióticos. Além disso, verificamos se as condições ambientais influenciam na quantidade média de visitas de insetos. Este artigo será enviado para publicação no periódico *Plant Ecology* (Fator de impacto: 1.615; Qualis – B1).

No quarto capítulo, intitulado “Gangorra na polinização de *Rhynchospora cephalotes* (L.) Vahl. (Cyperaceae): influência da localização das plantas no papel do vento e de insetos como vetores de pólen”, foi testada a influência da localização no ambiente em que indivíduos de *R. cephalotes* se encontram, borda e interior de mata, na ação e participação dos vetores de pólen, vento e insetos. Discutimos as condições ambientais da borda e do interior de mata e como eles podem afetar os vetores de pólen e a importância da manutenção da ambofilia nesta espécie. Este artigo será enviado ao periódico *Ecological Research* (Fator de Impacto: 1.338; Qualis – B1).

Por fim, o quinto capítulo intitulado “Reconstrução ancestral dos atributos florais e reprodutivos na Tribo Rhynchosporeae (Cyperaceae): uma adaptação à entomofilia?”, analisamos nove atributos florais e reprodutivos que estão associados à anemofilia e

entomofilia em 79 espécies da tribo Rhynchosporae, o que representa cerca de 20% da tribo, incluindo a variedade morfológica, taxonômica, ecológica e geográfica da tribo. Neste estudo foi possível compreender como os atributos relacionados à entomofilia surgiram e discutimos a importância de cada um deles para a polinização das espécies da tribo. Pretende-se enviar este manuscrito para o *Botanical Journal of the Linnean Society* (Fator de impacto: 2.523 Qualis - A2).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Polinização abiótica

Polinização mediada por vetores abióticos ocorre em cerca de 20% das Angiospermas, mas não é tão bem estudada e reconhecida quanto a polinização biótica (ACKERMAN, 2000). Alguns padrões servem como base para definições gerais da polinização abiótica, tais como a grande produção de grãos de pólen, a exposição das anteras e estigmas, a redução das partes florais e a natureza dicogâmica (separação temporal dos órgãos masculinos e femininos na flor) das plantas (ACKERMAN, 2000). A polinização abiótica pode ser reconhecida em três diferentes síndromes, a anemofilia (polinização pelo vento), epidrofilia (polinização pela superfície aquática, no qual o pólen é liberado na água e flutua até atingir o estigma) e hidrofília (polinização sob a água) (FAEGRI; PIJL, 1979; ENDRESS, 1994; ACKERMAN, 2000).

2.1.1 Anemofilia

A polinização pelo vento evoluiu ao menos 65 vezes nas Angiospermas, a partir de ancestrais que apresentavam polinização biótica (LINDER, 1998), sendo observada em 60 famílias, representando 16% das Angiospermas (ACKERMAN, 2000). A polinização pelo vento é muito mais comum do que a polinização pela água, ocorrendo em 98% das plantas polinizadas abioticamente (FAEGRI; PIJL, 1979; WILLMER, 2011).

Na polinização pelo vento as correntes de ar irão transportar os grãos de pólen a certa distância, de uma flor para outra, sendo geralmente considerado um processo localizado e menos preciso em comparação com a polinização biótica, tendo sucesso apenas em lugares onde o transporte de pólen não é obstruído por vegetação densa e onde muitos indivíduos de uma mesma espécie crescem próximos uns dos outros (LEPPIK, 1955; FAEGRI; PIJL, 1979; REGAL, 1982; ENDRESS, 1994; BOWKER; CRENSHAW, 2007b). Entretanto, Ackerman (2000) e Friedman e Harder (2004) afirmam que a anemofilia é um processo direcionado, no qual a morfologia das inflorescências, flores, e muitas vezes brácteas e ramos, interagem com o vento de forma complexa para facilitar a polinização.

Segundo Bowker e Crenshaw (2007a, b), sob determinadas condições ambientais, como céu claro e ventos calmos (próximo de 0 m/s-1), pode haver um campo elétrico entre cargas negativas na superfície das plantas, concentrados em pontos como na superfície dos estigmas, e grãos de pólen dispersos pelo vento com carga positiva, podendo influenciar na captura do pólen no ar. Os mesmos autores afirmam, contudo, que o papel da força

eletrostática na captura do pólen depende das características do pólen, como forma, tamanho, massa e carga, podendo o pólen ser atraído de milímetros ou até centímetros de distância da planta. Portanto, Bowker e Crenshaw (2007a, b) afirmam ainda que a força eletrostática pode ser importante e até dominante em algumas circunstâncias na dispersão, transporte e captura do grão de pólen disperso pelo vento, contudo, são as forças aerodinâmica e gravitacional que governam esse o processo.

Adaptações na morfologia das plantas que aumentam a captura do pólen devem ter sido favorecidas pela seleção natural (BOWKER; CRENSHAW, 2007b), podendo ter ocorrido, segundo Culley, Weller e Sakai. (2002) devido à falta de insetos polinizadores ao longo do tempo, colonização de novos habitats ou por alterações antrópicas, tais como a fragmentação de habitat, bem como um ambiente em que fosse possível a liberação, transporte e deposição de grãos de pólen no estigma. Em geral, plantas anemófilas apresentam flores unissexuais ou hermafroditas dicogâmicas, perianto reduzido ou ausente, estigmas e anteras expostos, anteras que dispersam rapidamente grãos de pólen, que são pequenos, secos, sem pollenkitt, e produzidos em grande quantidade, estigma bifido, com grande área receptiva, número reduzido de óvulos e alta razão pólen/óvulo (CRUDEN, 1977; FAEGRI; PIJL, 1979; ENDRESS, 1994; LINDER, 1998; ACKERMAN, 2000; CRUDEN, 2000).

De acordo com Friedman e Barrett (2008), considerando as relações filogenéticas, sugeriram que a anemofilia evoluiu de forma correlacionada positiva com o tipo de habitat aberto, flores unissexuais, sistema sexual dicogâmico, flores com apenas um óvulo, relativamente pequenas, e sem néctar. Com relação à evolução correlacionada com o habitat aberto, Friedman e Barrett (2008) e Rech *et al.* (2016) afirmam que há uma limitação do surgimento da polinização pelo vento em habitats fechados devido à estrutura da vegetação circundante. Adicionalmente, segundo Rech *et al.* (2016), comunidades ricas de espécies, com vegetação densa poderia limitar o transporte de pólen e alcançar o estigma de plantas coespecíficas. A correlação com flores unissexuais e sistema sexual dicogâmico pode estar relacionada ao fato de a remoção e captura de pólen ser eventos independentes, de forma que estruturas diferentes são necessárias para otimizar a dispersão e captura de pólen (NIKLAS, 1985; FRIEDMAN; HARDER, 2004; FRIEDMAN; BARRETT, 2008). Além disso, a dicogamia pode ter sido selecionada ao longo do processo evolutivo evitando a autofertilização (FRIEDMAN; BARRETT, 2008).

Friedman e Barrett (2008) encontraram forte evidência de que a redução do número de óvulos ocorreu após a evolução da polinização mediada pelo vento, sugerindo que esta é uma adaptação a anemofilia. Os autores afirmam que plantas polinizadas pelo vento não são

capazes de capturar muitos grãos de pólen e fertilizar muitos óvulos. Por outro lado, Friedman e Harder (2004), encontraram uma maior quantidade de pólen em estigmas de espécies anemófilas, que o número de óvulos. Uma explicação mais plausível dada por Friedman e Barrett (2008) para o número reduzido de óvulos foi de que a produção de flores polinizadas pelo vento é de baixo custo, favorecendo a estratégia de poucos óvulos por flor e muitas flores por planta, ou ainda, carpelos uniovulados poderia ser um mecanismo para aumentar a competição no tubo polínico devido as plantas anemófilas capturarem um grande número de pólen interespecífico. Portanto, de acordo com estes autores, a produção de muitas flores com menos óvulos, e a separação espacial das flores pode aumentar a probabilidade de capturar os grãos de pólen intraespecíficos.

A correlação positiva da anemofilia com flores pequenas e com flores não vistosas indica que a polinização pelo vento evoluiu mais frequentemente em linhagens com flores destes tipos, e uma vez estabelecidas são raramente perdidas. Da mesma forma, o néctar e a polinização pelo vento evoluíram de forma dependente, estando a ausência de néctar correlacionada positivamente, e o néctar sendo perdido mais frequentemente em clados com representantes anemófilos (FRIEDMAN; BARRETT, 2008).

2.1.2 Ambofilia

A polinização pelo vento pode ocorrer em adição à polinização por insetos (ambofilia), sendo considerado um estágio estável, intermediário na transição para a anemofilia ou uma adaptação para a entomofilia, que é mais rara visto que a polinização pelo vento frequentemente envolve a redução de características florais que seriam difíceis de ser readquiridas (CULLEY; WELLER; SAKAI, 2002). Linder (1998), porém, afirma que a adaptação da anemofilia para a entomofilia pode ocorrer e que análises filogenéticas sugerem algumas adaptações como na espécie *Rhynchospora ciliata* (Cyperaceae), estudada por Leppik (1955) e recentemente por Costa e Machado (2012), que comprovaram o papel das brácteas involucrais e anteras na atração de insetos. Wragg e Johnson (2011), por sua vez, também demonstraram que houve polinização por insetos em espécies de *Cyperus*, sendo a cor das brácteas involucrais uma característica funcional chave para a transição.

Assim, para a readaptação à entomofilia, outras estruturas, como as brácteas involucrais e anteras, podem assumir o papel na atração de insetos sem que características antes perdidas sejam readquiridas. Contudo, o estabelecimento da ambofilia pode ser mantido apenas quando a combinação dos vetores, vento e insetos, resultam em maior formação de frutos do que cada sistema de polinização independente (CULLEY; WELLER; SAKAI,

2002). Esta condição foi observada em *Rhynchospora ciliata*, sendo a ambofilia considerada uma estratégia que resulta em aumento do sucesso reprodutivo da espécie (COSTA; MACHADO, 2012).

Entretanto, de acordo com análise filogenética de Linder (1998), mesmo plantas que apresentam características anemófilas, tais como numerosas e pequenas flores, sem perianto ou com perianto reduzido e com pólen seco, podem ser também visitadas por insetos. Porém, o mesmo autor ainda discute que, embora estas flores sejam visitadas e polinizadas por insetos, grande quantidade de pólen é dispersa pelo vento e, se por alguma razão a polinização por insetos não ocorrer, a presença de atributos para a polinização pelo vento, mesmo ao custo de uma polinização biótica efetiva, constituiria uma vantagem seletiva. Dessa maneira, características que fazem a anemofilia mais eficiente podem não ser exclusivas para a polinização pelo vento.

2.2 Adaptação à entomofilia em cyperaceae

Apesar de a família Cyperaceae ser caracteristicamente anemófila, estudos demonstraram que algumas espécies podem apresentar características que podem atrair insetos polinizadores, tais como a presença de brácteas involucrais brancas ou amarelos, anteras coloridas, brancas, amarelas ou azuis (LEPPIK, 1955; THOMAS, 1984; DAHLGREN; CLIFFORD; YEO, 1985; RAMOS; FONSECA, 2006; WRAGG; JOHNSON, 2011; COSTA; MACHADO, 2012). Em *Rhynchospora ciliata*, Leppik (1955) considerou que as brácteas involucrais formavam uma corola secundária, havendo tendência à redução do número de brácteas involucrais, com a degeneração de alguns para pequenas brácteas, formando uma simetria actinomorfa, especialmente adaptada para a população rica de insetos tropicais. Costa e Machado (2012) observaram que, tanto as brácteas involucrais quanto as anteras de *R. ciliata* refletem luz ultravioleta, visível para as abelhas polinizadoras desta espécie, tendo os hipsofilos e as anteras brancas a função de atrair esses insetos à longa e à curta distância, respectivamente. Além disso, Magalhães *et al.* (2005) e Wragg e Johnson (2011) verificaram que espécies de *Eleocharis* e *Cyperus*, respectivamente, emitem voláteis orgânicos, que podem estar associados à reversão da anemofilia para a entomofilia na família.

Entretanto, Thomas (1984) observou abelhas visitando outras espécies do gênero *Rhynchospora* com brácteas involucrais verdes ou reduzidos, e afirmou que espécies desse gênero com atributos como pólen pegajoso, anteras brancas, expostas verticalmente, inflorescências congestionadas, flores estaminadas, concentrando recurso em um local, facilitando o contato do inseto com o estigma enquanto coleta pólen, podem garantir a visita regular de

muitos insetos. Neste contexto, Linder (1998) afirma que existem diferentes caminhos para a adaptação à entomofilia e que é necessária uma análise das diferentes estruturas que poderiam funcionar como atrativos e recompensa para os polinizadores, podendo ser um indicativo da plasticidade morfológica e evolutiva das Angiospermas.

2.3 Estudos filogenéticos em *rhynchospora*

Rhynchospora é um gênero cosmopolita com ca. de 250 espécies distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do mundo, com maior concentração no continente americano (GUAGLIANONE, 2001). É considerado o gênero de Cyperaceae de maior riqueza no Brasil, com 157 espécies, das quais 40 são endêmicas (LUCENÑO; ALVES; MENDES, 1997; ALVES *et al.*, 2009; CNIP, 2009).

Estudos filogenéticos moleculares da família Cyperaceae, Muasya *et al.* (1998, 2000) apontam uma relação próxima entre os gêneros *Rhynchospora* e *Pleurostachys*, que juntos forma a tribo Rhynchosporae, e indicaram que eles formam um clado, separado de todos os outros gêneros. Em um estudo filogenético molecular com a tribo Rhynchosporae, que inclui ambos os gêneros, Thomas, Araujo e Alves (2009) realizaram uma análise preliminar utilizando 41 espécies de *Rhynchospora* e três de *Pleurostachys* e sugerem a partir das reconstruções obtidas que o gênero *Pleurostachys* está dentro do gênero *Rhynchospora*.

Thomas (1984) realizou um dos primeiros estudos relacionando atributos florais de *Rhynchospora* à filogenia. Segundo o autor (THOMAS, 1984), as brácteas involucrais brancas no gênero surgiram pelo menos cinco vezes de forma independente. Dois estudos recentes realizaram análise de reconstrução ancestral de caráter em *Rhynchospora* utilizando filogenias geradas a partir de dados moleculares. Lucero *et al.* (2014) realizaram reconstrução ancestral em 9 espécies de *Rhynchospora* utilizando atributos que consideraram importantes para a evolução das flores e inflorescências do gênero, tais como número de brácteas florais estéreis, número de estames em flores bissexuais, presença de perianto, comprimento do estilete, ramificação do estigma, e taxas relativas de exposição de anteras e estigmas. Assim, estes autores verificaram que características das flores e espiguetas suportam a diversificação de várias linhagens. Além disso, nas flores bissexuais no qual o androceu se desenvolve mais rápido que o gineceu pode ser um importante passo para a transição do sistema de polinização pelo vento para a polinização por insetos (LUCERO *et al.*, 2014).

Buddenhagen, Thomas e Mast. (no prelo), realizaram uma análise de reconstrução ancestral da tribo Rhynchosporae (*Rhynchospora* + *Pleurostachys*) utilizando 79 espécies, englobando assim 20% da tribo, e toda variação morfológica, taxonômica, ecológica e

geográfica. Neste estudo (BUDDENHAGEN, THOMAS E MAST, no prelo) caracteres florais conspícuos que poderiam ser atrativos foram mapeados em uma árvore filogenética datada. Buddenhagen, Thomas e Mast. (no prelo) verificaram que os atributos conspícuos surgiram múltiplas vezes na tribo e que não houve correlação entre o surgimento destes caracteres com o tipo de habitat em que as espécies ocorrem

3 GRADIENTE DE ATRIBUTOS FLORAIS EM *RHYNCHOSPORA* (CYPERACEAE): EVIDÊNCIAS DE AMBOFILIA E ENTOMOFILIA EM UMA FAMÍLIA ESSENCIALMENTE ANEMÓFILA

Ana Carolina Galindo da Costa¹, William Wayt Thomas², Paulo Milet-Pinheiro¹, Artur Campos Dália Maia³, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro⁴, Isabel Cristina Machado^{1*}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Recife, Pernambuco, Brazil. ²The New York Botanical Garden, Bronx, New York, U.S.A. ³Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Zoologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Química Fundamental, Recife, Pernambuco, Brazil.

Transição da anemofilia para entomofilia

*corresponding author: imachado@ufpe.br

Manuscrito a ser enviado ao periódico *Annals of Botany*

RESUMO

Contexto e objetivos: Atributos florais, como cores e odores, são estratégias evolutivas utilizadas pelas plantas para atrair animais polinizadores e que estão ausentes em grupos essencialmente anemófilos, como Cyperaceae. Em espécies de *Rhynchospora*, contudo, existem evidências de insetos como visitantes florais, o que sugere a existência de atributos florais relacionados a atração de insetos polinizadores. Nosso estudo teve como objetivo classificar as espécies em diferentes sistemas de polinização a partir dos atributos florais e verificar os vetores de pólen de representantes do gênero *Rhynchospora*.

Métodos: Foram analisadas 16 espécies de *Rhynchospora* com relação a morfometria de inflorescências e flores, processo de antese, cores das brácteas involucrais e florais, emissão de voláteis, quantidade e comportamento de visitantes florais e sistema reprodutivo.

Resultados chave: A partir dos atributos florais, observações de campo e análise dos sistemas reprodutivos, as espécies de *Rhynchospora* foram classificadas como anemófilas, ambófilas e entomófilas. Espécies dotadas de inflorescências do tipo panícula, inconspícuas e amarronzadas, tais como *R. dissitispicula*, foram consideradas anemófilas e não foram visitadas por insetos, sendo o vento o único vetor de pólen. Espécies com atributos considerados atrativos, como brácteas florais laranjas, amarelas, ou brancas ou brácteas involucrais verdes e brancas, mas também apresentando características morfológicas anemófilas (*R. alba*, *R. barbata*, *R. cephalotes*, *R. ciliata*, *R. elatior*, *R. globosa* e *R. pallida*, *R. pubera*) foram classificadas como ambófilas, e, no geral, foram polinizadas tanto pelo vento quando por insetos. Já as espécies entomófilas não apresentam atributos anemófilos (*R. albiceps*, *R. consanguinea*, *R. latifolia*, *R. speciosa*) sendo polinizadas exclusivamente por insetos. Com exceção de *R. barbata*, a emissão de voláteis florais foi verificada em todas as espécies, sendo este um registro inédito para o gênero. A morfologia floral foi essencial para distinguir espécies anemófilas de ambófilas e das entomófilas ($P < 0.05$), e diferenças de composição e quantidade de compostos emitidos permitiram diferenciar espécies anemófilas de ambófilas ($p < 0.05$).

Conclusões: Os diferentes atributos florais presentes de forma gradual em diferentes espécies levam a distintos sistemas de polinização em *Rhynchospora*, sendo características essenciais para a atuação dos vetores de pólen no gênero, tais como vento, insetos ou ambos.

Palavras-chave: anemofilia, ambofilia, entomofilia, atratividade, polinização, *Rhynchospora*, transição.

INTRODUÇÃO

As angiospermas apresentam flores com grande variedade de atributos, tais como cores e odor, que podem ser consideradas estratégias adaptativas essenciais para o sucesso reprodutivo, e que determinam quais vetores de polinização atuam, sejam eles bióticos, como insetos, aves, morcegos, ou abióticos, como a água e o vento (Faegri e Pijl, 1979; Endress, 1994; Dafni *et al.*, 2005). Animais polinizadores são primeiramente atraídos para as flores pela cor ou odor (Endress, 1994; Proctor *et al.*, 1996; Roy e Raguso, 1997) e, dessa maneira, determinados grupos de animais visitam flores que possuem um conjunto de atributos florais relacionados com os seus sentidos visual e/ou olfativo (Leppik, 1955; Faegri e Pijl, 1979; Endress, 1994; Fenster *et al.*, 2004; Chittka e Raine, 2006).

Em alguns grupos de angiospermas ocorreu um processo de transição da polinização biótica para polinização abiótica, e características florais que antes tinham função atrativa foram reduzidas ou perdidas (Leppik, 1955; Whitehead, 1983; Linder, 1998; Ackerman, 2000; Culley *et al.*, 2002). A polinização pelo vento pode ter sido favorecida pela falta de insetos polinizadores ao longo do tempo, devido à colonização de novos habitats ou por alterações antrópicas, tais como a fragmentação de habitat, ambientes com bastante vento em que fosse possível a liberação, transporte e deposição de grãos de pólen no estigma por este vetor de pólen (Cox, 1991; Culley *et al.*, 2002; Mangla e Gupta, 2015). Desta forma, atributos florais que favoreceram a polinização pelo vento e a redução dos custos energéticos associados à atração de polinizadores foram selecionados. Em geral, plantas anemófilas apresentam flores inodoras, com perianto reduzido ou ausente, estigmas e anteras expostos, anteras com mecanismo de deiscência explosivo, grãos de pólen pequenos, secos, sem *pollenkitt* e produzidos em grande quantidade, estigma bífido, com grande área receptiva, número reduzido de óvulos e alta razão pólen/óvulo (Cruden, 1977; Faegri e Pijl, 1979; Endress, 1994; Ackerman, 2000).

Diversos estudos têm registrado casos de adaptação da anemofilia para entomofilia, como em representantes do gênero *Rhynchospora*, *Cyperus* e *Eleocharis*, pertencentes à família Cyperaceae (Leppik, 1955; Dahlgren *et al.*, 1985; Linder, 1998; Magalhães *et al.*, 2005; Wragg e Johnson, 2011; Costa e Machado, 2012; Costa *et al.*, em prep.; capítulo 5 desta tese). Nesta família, o gênero *Rhynchospora* apresenta uma variedade de atributos que podem estar relacionados à adaptação à entomofilia, como brácteas involucrais brancas (Leppik, 1955; Linder, 1998; Costa e Machado, 2012), brácteas florais brancas (Magalhães *et al.*, 2005; Costa e Machado, 2012), e anteras coloridas (Leppik, 1955; Dahlgren *et al.*, 1985).

Desta forma, partes florais com função atrativa que foram perdidas não são recuperadas (Linder, 1998; Culley *et al.*, 2002), mas estruturas já presentes neste grupo, como as brácteas involucrais e florais, podem adquirir função na atração de animais polinizadores.

Rhynchospora, o terceiro maior gênero da subfamília Cyperoideae com aproximadamente 354 espécies (Strong, 2006), apresenta grande variação no tipo de inflorescência, morfologia das espiguetas e flores e nos sistemas de polinização (Lucero *et al.*, 2014; Costa *et al.*, em prep.; capítulo 4 desta tese). Deste modo, é necessária uma análise das diferentes estruturas em distintas espécies que podem funcionar como atrativos e recursos para os polinizadores para entender as diferentes rotas para a adaptação à entomofilia (Linder, 1998; Costa *et al.*, em prep.; capítulo 2 desta tese).

O presente estudo teve como objetivo analisar os atributos florais e o sistema reprodutivo de representantes do gênero *Rhynchospora*, com objetivo de entender a relação desses aspectos morfológicos e reprodutivos com diferentes estratégias de polinização. A partir deste estudo foi possível delimitar atributos relacionados às síndromes de polinização, como anemofilia, ambofilia e entomofilia em *Rhynchospora*. Desta forma, este estudo pode servir como base para estudos de síndromes de polinização de espécies pertencentes a famílias essencialmente anemófilas, mas que possuem representantes que são visitados por insetos.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais de estudo e espécies estudadas

Os trabalhos de campo foram realizados em seis áreas localizadas em três diferentes ecossistemas: i) Floresta Atlântica, em três remanescentes, um localizado no Parque Estadual Dois Irmãos (8°7' S, 34°52' W), um no Jardim Botânico do Recife (08°04' S, 34°59' W) em Recife, Pernambuco, Brasil e outro na Reserva Biológica de Guaribas (6° 43' S, 35° 8' W), em Mamanguape, Paraíba, Brasil; ii) Campo Rupestre, área natural nos arredores do campus da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (18°11' S, 43°34' W), em Diamantina, Minas Gerais; e iii) Floresta de Pinus, no Parque Nacional de Apalachicola, próximo a Tallahassee, Estado da Flórida, e na Pineland National Reserve, no estado de Nova Jérsei, EUA. As observações de campo e análises foram realizadas entre abril de 2013 a novembro de 2016.

Foram estudadas 16 espécies de *Rhynchospora*, as quais estão listadas na tabela 1, junto com os ecossistemas onde foram estudadas. Espécimes-testemunhos das espécies foram coletados, identificados, herborizados e depositados nos herbários UFP Geraldo Mariz, para

as amostras coletadas no Brasil, e no herbário William and Lynda Steere do Jardim Botânico de Nova York, para as amostras coletadas nos Estados Unidos. Para 11 espécies foram realizadas análises referentes à toda metodologia descrita abaixo, como análise das características florais, sistema de polinização e frequência de visitantes florais, fluxo polínico e análise de características do pólen. Contudo, para as três espécies estudadas nos Estados Unidos (*R. alba*, *R. pallida* e *R. latifolia*), fizemos análises de morfometria, razão pólen/óvulo e observações de visitantes florais. E, em Diamantina, para as espécies *Rhynchospora riedeliana* e *Rhynchospora* sp. foi possível analisar a morfologia e voláteis florais.

Características florais

Morfometria floral e antese

Para análise da morfometria, 10 inflorescências e flores de indivíduos diferentes de cada uma das 16 espécies foram coletadas e fixadas em álcool 70%. O tipo de inflorescência de cada espécie foi definido como: a) panícula de espiguetas, b) capítulo parcial de espiguetas ou c) capítulo único de espiguetas (adaptado de Lucero e Vegetti, 2012). Para cada espécie, foram monitoradas cerca de 10 inflorescências com botões em pré-antese para análise do processo de antese e horário e duração da receptividade estigmática. As observações começaram no início da manhã, antes do processo de antese iniciar, às 0600 h e terminaram no momento em que as flores observadas não estavam mais funcionais, com horário variado, de espécie para espécie (das 1200 às 1500 h). A receptividade estigmática foi investigada em 20 flores de indivíduos diferentes para cada espécie, 10 flores no início da antese, e 10 flores no final da antese usando peróxido de hidrogênio, que reage com o tecido em atividade produzindo bolhas (Dafni *et al.*, 2005).

Atrativos secundários: cores e odores

Foram feitas medidas das espiguetas e partes florais, contado o número de flores e analisada a sexualidade das flores. As brácteas involucrais, brácteas florais e anteras foram categorizadas de acordo com as cores que apresentaram.

Para as espécies estudadas no Brasil, 10 inflorescências e flores de indivíduos diferentes foram imersas em solução de vermelho neutro (1:1000) e lavadas em água corrente para detectar e localizar possíveis osmóforos (glândulas de cheiro) (Vogel, 1990).

A técnica de extração por “headspace” dinâmico (ver Dötterl e Jürgens, 2005) foi escolhida para amostragem de compostos voláteis (VOCs) emitidos durante o período de antese por inflorescências e flores das seguintes espécies: *Rhynchospora albiceps*, *R. barbata*,

R. cephalotes, *R. consanguinea*, *R. dissitispicula*, *R. elatior*, *R. globosa*, *R. setigera*, *R. speciosa*, *R. riedeliana* e *Rhynchospora* sp.

Foram coletadas de duas a cinco amostras de inflorescências e os controles (material vegetativo e ar ambiente) para cada espécie. Para cada amostra coletada, dez inflorescências (panículas ou capítulos) foram encobertas, por pelo menos uma hora, em um saco de polietileno. Os voláteis emitidos retidos dentro do saco foram então capturados por 15 minutos em chromatoprobes com auxílio de uma bomba de vácuo (G12/01 EB, Rietschle Thomas, Puchheim, Germany).

As amostras coletadas foram analisadas através de cromatografia gasosa – espectrometria de massa (GC-MS) em um sistema quadrupolo Agilent 5975C Series GC/MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com uma coluna apolar DB-5 (Agilent J&W; 60 m x 0.25 mm d.i., 0.25 µm espessura da película). Para cada amostra, uma alíquota de 1,0 µl foi injetada em modo *splitless*. A temperatura do GC foi ajustada em 40 °C por 2 min, então aumentada em 4 °C min⁻¹ até 230°C e mantida por 5 min. O fluxo de hélio foi mantido em pressão constante de 7,0 psi. A interface do MS foi definida em 230 °C e os espectros de massa registrados em 70eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0,5 scan-s de m/z 40-350. Os compostos foram identificados a partir de comparação de seus espectros de massa e tempos de retenção aos padrões autênticos disponíveis nas bibliotecas de referência MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition, integradas ao software Agilent MSD Productivity ChemStation Agilent Technologies, Palo Alto, EUA). As análises referentes à composição e quantidade de compostos produzidos pelas espécies se encontram no subtópico abaixo.

Síndromes de Polinização

Com base na presença/ausência de atrativos secundários das flores e inflorescências, as espécies de *Rhynchospora* foram classificadas nas síndromes de polinização, anemofilia, ambofilia e entomofilia. Os atributos considerados para esta classificação foram o tipo de inflorescência, as cores das brácteas florais e involucrais, cor das anteras e os voláteis florais emitidos.

Espécies anemófilas foram consideradas como aquelas que apresentaram características morfológicas típicas de plantas com esta síndrome, descrita por Faegri e Pijl (1979). Para diferenciar espécies ambófilas das anemófilas e entomófilas foi utilizado o critério de que nessas espécies, embora existam atributos morfológicos característicos da anemofilia, elas apresentam atrativos secundários relacionados com a atração de vetores

bióticos. Já as espécies consideradas predominantemente entomófilas foram aquelas que apresentaram os atrativos secundários e ausência de atributo anemófilo.

Após a classificação das espécies de acordo com seus atributos florais foi calculado o índice de dissimilaridade de Bray Curtis e baseado nessa matriz foi realizada uma análise de NMDS (Escalonamento multidimensional não métrico) utilizando como fatores as espécies e as síndromes de polinização de cada espécie. Possíveis diferenças entre atributos florais de espécies de diferentes síndromes de polinização (anemofilia, ambofilia e entomofilia) foram testados a partir de uma ANOSIM, considerando $\alpha=0.05$.

Além disso, os voláteis emitidos pelas flores e inflorescências das espécies de *Rhynchospora* foram analisados quanto a possíveis diferenças entre a composição e quantidade de compostos emitidos entre espécies de diferentes síndromes de polinização. Para isso, os dados de quantidade de emissão de cada composto de cada espécie foram transformados em porcentagem e posteriormente em raiz quadrada para normalização dos dados. O índice de dissimilaridade de Bray Curtis foi calculado e, baseado nessa matriz, foi realizada uma análise de NMDS utilizando como fatores as espécies e as síndromes de polinização de cada espécie. Possíveis diferenças entre os compostos e quantidade dos compostos produzidos entre as espécies e entre espécies de diferentes síndromes de polinização foram testados a partir de uma ANOSIM, considerando $\alpha=0.05$. Ambas as análises foram realizadas no programa Primer 6.0.

Sistema de polinização

Os experimentos para determinar qual o sistema de polinização, a fim de entender a contribuição de cada um dos vetores de pólen (abióticos e bióticos) para a formação de frutos, feitos exclusivamente com 11 espécies estudadas no Brasil, a partir da exclusão de vetores, seguindo protocolos descritos em Costa e Machado (2012). Entre 10 a 15 inflorescências de indivíduos diferentes de cada espécie foram utilizadas nos seguintes tratamentos: (1) autopolinização espontânea (AE) - inflorescências foram encobertas com papel semi-impermeável, evitando a polinização pelos dois vetores, vento e insetos; (2) polinização pelo vento (PV) - inflorescências foram ensacadas com tecido cuja malha tinha abertura que impedia o acesso de insetos, mas permitia a passagem dos grãos de pólen, os quais haviam sido previamente medidos; (3) polinização natural (controle) (PN), inflorescências foram deixadas expostas em condições naturais para serem polinizadas por ambos os vetores de pólen, bióticos e/ou abióticos. Comparando (1) com (2) pode-se inferir a participação do vento, e (3) com (2) e (1) a participação dos insetos no sucesso reprodutivo. Foi realizado

teste Qui-quadrado para verificar possíveis diferenças entre os tratamentos de uma mesma espécie, levando em consideração $\alpha=0.05$.

Visitantes florais, fluxo polínico e pólen

Dentre as espécies que apresentaram visitas de insetos, tanto as espécies observadas no Brasil como nos EUA, a quantidade de visitas e o comportamento de cada animal polinizador foram monitorados. Para isso, foi delimitado o espaço de 1m^2 com agrupamento de indivíduos de cada espécie e as observações foram realizadas durante o período de antese. Para as espécies estudadas no Brasil foram feitas cerca de 30 horas de observação para cada espécie, das 0700 – 1500 h. Para as espécies observadas nos Estados Unidos foram feitas observações focais de cerca de três horas para cada espécie, no período das 0900 às 1200 h.

Os visitantes florais foram capturados utilizando-se recipientes de boca larga e tampa, montados a seco, identificados em nível de ordem, gênero, e alguns ao nível de espécie, e depositados como material testemunho na coleção do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva da Universidade Federal de Pernambuco. Fotografias foram tomadas para registrar os visitantes e auxiliar na descrição do comportamento destes animais.

Além disso, foi verificado se os insetos realmente são capazes de coletar e transferir grãos de pólen de uma inflorescência para outra de outro indivíduo da mesma espécie. Este experimento foi realizado para espécies estudadas no Brasil, segundo a metodologia de Thomas (1984), na qual os grãos de pólen de inflorescências previamente selecionadas de cada espécie estudada foram marcadas com partículas fluorescentes de diferentes cores. Foi observado o momento em que os visitantes florais pousaram na inflorescência, doadora do pólen, com o pólen marcado e os insetos foram seguidos até a segunda inflorescência, receptora do pólen, sendo capturados imediatamente após a visita e a inflorescência receptora coletada para análise das flores. Foi verificado, ainda no campo, se o inseto e a inflorescência receptora apresentavam grãos de pólen ou pós fluorescentes no corpo e nas flores, iluminando-os com luz negra e observando com auxílio de lupa de campo. O experimento foi realizado para os visitantes florais mais frequentes, sendo repetido 10 vezes para cada visitante floral/espécie de planta.

Após análise dos sistemas de polinização de cada espécie, atributos polínicos relacionados aos sistemas de polinização, tais como razão pólen/óvulo, e presença/ausência de *pollenkitt* foram analisados. Para medir a razão pólen/óvulo (P/O), todos os grãos de pólen de anteras ainda fechadas de 10 flores hermafroditas de diferentes escapos florais de cada espécie foram retirados em uma solução de 1 ml de ácido láctico e glicerina (3:1) e contados em uma

câmara de Neubauer (Maêda, 1985). Ao mesmo tempo, o número de óvulos foi contabilizado retirando-se todos os óvulos do ovário da mesma flor, os quais foram contados sob estereomicroscópio. Foi também analisado o pólen fresco de cada espécie sob microscópio óptico para detectar lipídios em sua superfície (*pollenkitt*) que o torna pegajoso (Dafni *et al.* 2005). Possíveis diferenças das razões P/O entre espécies polinizadas exclusivamente pelo vento, espécies ambófilas e aquelas polinizadas exclusivamente por insetos foram analisadas através de uma ANOVA unifatorial, com $\alpha=0,05$. Diferenças de presença/ausência de *pollenkitt* entre as espécies de diferentes sistemas de polinização não foram testadas, devido ao fato de que todas as espécies apresentaram este atributo.

RESULTADOS

Características florais

Morfometria e antese

As 16 espécies de *Rhynchospora* estudadas apresentam populações com indivíduos localizados bastante próximo uns dos outros, e têm como características reprodutivas em comum flores agrupadas em inflorescências inconspícuas do tipo espiguetas, que se agrupam de diferentes maneiras, tais como panículas e capítulos. Todas as flores são protegidas por brácteas florais, com androceu formado por três estames, com filetes que se alongam durante o processo de antese, que começa entre 0630 - 0700 h, expondo as anteras; o gineceu é composto por ovário com um único óvulo, estilete e estigma, que também se alongam no início da antese.

Com relação ao agrupamento das inflorescências, entre as espécies selecionadas para o estudo, apenas *R. dissitispicula* apresentou inflorescência do tipo panícula de espiguetas, enquanto nas demais espécies as inflorescências estão mais agrupadas, formando capítulos compostos por espiguetas agrupadas no topo do escapo floral ou capítulos parciais (Fig. 1). Independente do tipo de agrupamento da inflorescência, apenas uma flor por espiguetas abre por dia. Quando a flor é hermafrodita e o androceu e gineceu estão funcionais no mesmo dia, a flor possui duração de apenas um dia; entretanto, quando a flor é protogínica, ela é funcional por dois dias. Nas flores que duram apenas um dia, a duração da antese vai até às 1300 h, podendo se estender até às 1500 h, como em *R. dissitispicula* e *R. elatior*. Nas flores que duram dois dias o gineceu deixa de ser funcional no primeiro dia entre 1300 e 1500 h e apenas no segundo dia entre 0630 e 0800 h as anteras estão deiscentes. Medidas florais e sexualidade das flores das espiguetas das espécies estudadas se encontram na tabela 1.

Atrativos secundários: cores e odores

A classificação e variação das espécies estudadas quanto à presença/ausência de atrativos secundários, incluindo a presença/ausência de odores atrativos para os insetos está na tabela 2. As espécies também variaram bastante com relação às cores das brácteas florais e das brácteas involucrais (Fig. 1). Além disso, dentro do grupo que apresenta brácteas involucrais verdes com mancha branca, o tamanho dessa mancha pode ser pequena, como em *R. albiceps* (cerca de 1 cm de comprimento), grande como em *R. consaguinea* (cerca de 2,5 cm), *R. ciliata* e *R. latifolia* (cerca de 3 cm) ou muito grande como em *R. speciosa* (cerca de 4 cm de comprimento).

Osmóforos não foram visualizados nas espécies estudadas, a partir da coloração pelo vermelho neutro, porém, emissão de voláteis florais (VOCs) foi detectada em todas as espécies de *Rhynchospora* analisadas (tabela 3). A complexidade dos buquês de voláteis florais diverge consideravelmente entre as espécies, sendo *R. dissitispicula* e *R. cephalotes* as espécies com buquês de odores que incluem compostos exclusivamente emitidos por estas espécies. Os compostos detectados em *Rhynchospora* pertencem a cinco classes de substâncias: 1) monoterpenos, com 11 compostos, 2) sesquiterpenos, com quatro compostos, 3) aromáticos, com três compostos, 4) alifáticos, com dois compostos e 5) homoterpenos, com 1 composto.

Dentre as espécies estudadas *R. cephalotes* emitiu o volátil mais forte e doce, sendo perceptível pelo olfato humano não-treinado a uma distância de 1 metro da inflorescência. Os compostos voláteis emitidos por cada espécie podem ser verificados na tabela 3.

Síndromes de polinização

A partir da análise de presença e ausência dos atributos florais de cada espécie foi possível verificar que houve diferença significativa entre as espécies que pertencem aos três grupos de sistema de polinização, anemofilia, ambofilia e entomofilia. Contudo, o valor global do teste R, foi baixo ($R=0.36$; $p=0.016$). Nos testes par a par não houve diferença significativa entre as espécies anemófilas e ambófilas ($R=0.27$; $p=0.25$). Contudo, houve diferença significativa entre espécies anemófilas e entomófilas (anemofilia vs entomofilia: $R=1$; $p=0.02$) e entre espécies ambófilas e entomófilas, apesar do resultado do teste de similaridade ter sido baixo ($R=0.33$, $p=0.02$) (Fig. 2 A).

Levando em consideração a composição e quantidade de cada composto (VOCs) emitido pelas flores e inflorescências de *Rhynchospora* houve diferença significativa entre as

espécies de cada síndrome de polinização, apesar de o resultado global do teste ter sido baixo ($R=0.25$; $p=0.002$). Houve diferença significativa entre a composição e quantidade de compostos emitidos entre espécies entomófilas e anemófilas ($R=1$; $p=0.002$), e entre espécies anemófilas e ambófilas ($R=0.59$; $p=0.001$). Contudo não é possível distinguir espécies entomófilas e ambófilas pelo odor ($R=0.043$; $p=0.18$) (Fig. 2 B).

Sistema de polinização

Os resultados obtidos a partir dos tratamentos realizados estão na tabela 4. *Rhynchospora dissitispicula* e *R. barbata* não apresentaram formação de frutos por inseto e a partir dos resultados dos experimentos verificou-se que são exclusivamente polinizadas pelo vento. Todas as demais espécies, que apresentaram brácteas involucrais brancas e/ou brácteas florais brancas ou amarelas possuem participação significativa dos insetos na polinização, como indicado pela maior formação de frutos no tratamento PN (Polinização Natural) quando comparado à polinização pelo vento (PV) ($p<0.05$). Dentre estas espécies, a PV também foi significativa em *R. albiceps*, *R. cephalotes*, *R. ciliata*, *R. elatior*, *R. globosa* e *R. pubera*, como indicado pela maior formação de frutos no tratamento PV quando comparado ao tratamento AE (Autopolinização espontânea) ($p < 0.05$), podendo classificá-las como ambófilas. *Rhynchospora consanguinea*, *R. setigera*, *R. speciosa* são espécies polinizadas exclusivamente por insetos, sem participação significativa do vento para formação de frutos (AE = PV) (tabela 4).

Visitantes florais, pólen e fluxo polínico

Foram registrados visitantes florais em 12 das 11 espécies em que indivíduos foram monitorados quanto a presença destes animais visitantes em campo: *Rhynchospora alba*, *R. albiceps*, *R. cephalotes*, *R. ciliata*, *R. consanguinea*, *R. elatior*, *R. globosa*, *R. latifolia*, *R. pallida*, *R. pubera*, *R. setigera* e *R. speciosa*. Diversos grupos de insetos, como abelhas, moscas e besouros, visitaram as espécies estudadas (Tabela 5, Figura 3) e apresentaram comportamentos variados.

As abelhas forragearam em flores de todas as espécies listadas acima, contudo sua frequência de visitas é baixa nas espécies que ocorrem em Campo Rupestre, tais como *Rhynchospora albiceps*, *R. consanguinea*, *R. elatior*, *R. globosa*, *R. setigera* e *R. speciosa*. A partir do experimento de transferência do pólen marcado com pó fluorescente, verificou-se que $73,3\% \pm 2.5\%$ das abelhas conseguiram transferir pólen de um indivíduo para o estigma de outro indivíduo; pólen marcado com pó fluorescente ficou preso ao corpo de todas as

abelhas, indicando que são bastante efetivas na realização de polinização cruzada nestas espécies de plantas.

Moscas visitaram flores de *Rhynchospora elatior*, *R. globosa* e *R. setigera*. Durante as visitas, estes insetos ovopositaram nas espiguetas e durante este processo promoviam ocasionalmente a polinização, principalmente entre espiguetas do mesmo indivíduo. Registramos apenas $3,23\% \pm 1.48\%$ de estigmas com pólen marcado com pó fluorescente após visita das moscas, além disso, apenas 12% das moscas apresentavam o pó fluorescente no corpo.

Foi registrada visita de besouros em 6 espécies ocorrentes em Campo Rupestre, exceto em *R. dissitispicula*. Os besouros se alimentavam de pólen e partes florais, como as brácteas involucrais, e foram bastante frequentes. Verificou-se que estes insetos foram capazes de transferir pólen entre diferentes indivíduos, havendo em média $2.25\% \pm 1.83\%$ de estigmas com pólen marcado com pó fluorescente após as visitas dos besouros, e cerca de 9% dos besouros foram encontrados com pólen marcado com o pó fluorescente no corpo, podendo-se classificar os besouros como polinizadores ocasionais. As espécies que apresentaram sistema de polinização apenas pelo vento, *R. dissitispicula* e *R. barbata*, não foram visitadas por insetos.

Todas as espécies estudadas apresentaram *pollenkitt*. A partir da razão pólen/óvulo de cada espécie estudada (tabela 1), verificou-se que não houve diferença significativa entre espécies polinizadas pelo vento, por insetos e por ambos ($F = 1.42$; g.l. = 2; $p = 0.27$).

DISCUSSÃO

As espécies selecionadas para o estudo apresentaram grande diversidade de atributos florais e reprodutivos, englobando aquelas que apresentam padrão de inflorescência e morfologia floral consideradas mais inconspícuas, como *R. dissitispicula*, formando um gradiente de espécies intermediárias até espécies que possuem atributos florais mais conspícuos, como *R. speciosa*. Os atributos florais relacionados à polinização pelo vento em Cyperaceae são plesiomórficos e os atributos relacionados à entomofilia surgiram diversas vezes no grupo (Thomas, 1984; Culley *et al.*, 2002; Buddenhagen *et al.*, no prelo; Costa *et al.*, em prep.; capítulo 2 da tese). Portanto, as diversas estratégias de polinização no grupo e a grande variação morfológica das brácteas involucrais e florais e a morfologia e disposição das espiguetas no escapo floral em *Rhynchospora* (Lucero *et al.*, 2014), podem ser importantes para atração e/ou ação dos vetores de pólen.

Desta forma a variação encontrada em *Rhynchospora* relacionada à cor e forma possibilitou classificar e distinguir as espécies anemófilas das entomófilas e as ambófilas das entomófilas e a partir de diferenças de composição e quantidade de compostos voláteis emitidos foi possível diferenciar as espécies anemófilas das ambófilas. As cores das flores e o sistema de visão de cores dos polinizadores foram selecionados durante o processo evolutivo de forma que os visitantes florais consigam distinguir as flores do plano de fundo, como os troncos e as árvores (Vorobyev e Brandt, 1997; Chittka *et al.*, 2001; Chittka e Raine, 2006). Deste modo, é provável que as cores das brácteas florais e involucrais de *Rhynchospora* possam ser distinguidas do plano de fundo, permitindo que estas espécies possam atrair insetos polinizadores. Além disso, a maioria dos insetos tem uma excelente acuidade olfativa e aprendem a associar o odor floral à presença de recursos, e, do ponto de vista da planta, as espécies que emitem odor floral apresentam uma vantagem seletiva por provavelmente garantir a atenção e constância dos animais polinizadores (Raguso, 2008; Wright e Schiestl, 2009). Desta forma, a emissão de odor nas espécies que já apresentam atributos morfológicos atrativos pode garantir e otimizar a atração de abelhas polinizadoras.

Rhynchospora dissitispicula foi considerada a espécie com características mais inconspícuas dentre as espécies analisadas. Apesar disso, esta espécie emitiu odores, tais como α -pinene e 1-Octen-3-ol, que podem ser considerados atrativos para insetos. O segundo composto, 1-Octen-3-ol, é o principal composto de flores com cheiro similar ao emitido por fungos, e pode ser bastante atrativo para moscas (Dudareva e Pichersky, 2006). Contudo, mesmo esta espécie emitindo odor, não houve visitas de insetos. Além disso, sua morfologia, como coloração amarronzada e disposição de espiguetas na panícula é totalmente adaptada à polinização pelo vento, que foi o único vetor de pólen desta espécie. A inflorescência do tipo panícula permite que o vento entre em contato com todas as flores da inflorescência de forma mais uniforme, do que quando as inflorescências estão concentradas em uma cabeça terminal, e que atue de forma eficiente para transferir grãos de pólen entre flores de indivíduos diferentes (Friedman e Harder, 2004). A inflorescência do tipo panícula foi considerada por Friedman e Harder (2004) uma solução evolutiva para favorecer a polinização pelo vento, por permitir sua interação com o vento de forma complexa, favorecendo este tipo de polinização. Portanto, a anemofilia pode ser um processo mais preciso do que historicamente é considerado (Ackerman, 2000; Friedman e Harder, 2004; Bowker e Crenshaw, 2007 a, b).

Uma das espécies consideradas ambófilas, *R. barbata*, apresenta atributos que poderiam atrair insetos, tais como espiguetas agrupadas em um capítulo terminal, concentrando o recurso, que é o pólen, brácteas florais laranjas e anteras brancas, contudo,

não foi detectado emissão de voláteis e esta espécie não apresentou visita de insetos, sendo polinizada apenas pelo vento. Segundo Rosas-Guerrero *et al.* (2014), a maioria das espécies apresenta como polinizador principal o vetor correspondente à síndrome de polinização que os atributos da flor indicam, contudo, muitas espécies possuem vetores de polinização secundários, que podem ser os principais ou únicos vetores de pólen e que geralmente correspondem ao vetor de polinização ancestral no grupo. Desta forma, mesmo *R. barbata* possuindo atributos que possam atrair insetos polinizadores, por não ter havido visitantes florais, o vento foi o único e efetivo polinizador desta espécie. Além disso, em espécies ambófilas, o vento e insetos podem assumir o papel de único vetor de pólen quando as condições não são favoráveis para um dos polinizadores (Costa *et al.*, em prep.; capítulos 3 e da tese).

Rhynchospora cephalotes apresenta poucos atributos conspícuos, contudo o fato desta espécie exalar odor floral forte e adocicado permite que abelhas polinizadoras sejam atraídas, sendo capazes de promover a polinização cruzada nesta espécie. De fato, dois dos compostos que constituem o buquê de odores florais dessa espécie, i.e. 2-fenil etanol e fenil etil acetato, são extremamente atrativos para diversas espécies de abelhas (Blight *et al.*, 1997; Dobson e Bergström, 2000; Raguso, 2004; Dobson, 2006; Dötterl e Vereecken, 2010).

Outras espécies mais conspícuas, como *R. albiceps*, *R. consanguinea*, *R. elatior*, *R. globosa*, *R. setigera* e *R. speciosa* e polinizadas por insetos, também emitem voláteis florais. A maioria dos compostos emitidos por essas espécies, tais como limoneno, ocimeno, fenil etil acetato, 2-fenil etanol, myrceno, é extremamente comum entre angiospermas, ocorrendo entre 54 a 71% das famílias de plantas com sementes (Knudsen *et al.*, 2006). Os registros de odor emitido pelas espécies de *Rhynchospora* aqui analisados constituem-se os primeiros para o gênero. Porém, em Cyperaceae já foi verificado odor em outros gêneros, como em *Eleocharis*, que foi caracterizado como floral e considerado fraco (Magalhães *et al.*, 2005), e em *Cyperus* (Wragg e Johnson, 2011), que consideraram o odor das duas espécies analisadas semelhante a outras espécies polinizadas por insetos. Os compostos emitidos por *Cyperus* detectados por Wragg e Johnson (2011) foram benzenos e monoterpenos, assim como também foram encontrado compostos destas classes de odor em *Rhynchospora*, embora não tenham sido os mesmos compostos.

As espécies que apresentaram partes florais conspícuas, como as brácteas florais amarelas de *Rhynchospora elatior*, laranjas em *R. globosa* e *R. speciosa* e brácteas florais brancas de *R. alba*, *R. albiceps*, *R. consanguinea*, *R. pallida*, *R. pubera* e *R. setigera*; e as brácteas involucrais brancas de *R. albiceps*, *R. consanguinea*, *R. ciliata*, *R. latifolia* e *R.*

speciosa podem ser capazes de atrair os visitantes florais por ser possível distingui-las do plano de fundo. As cores das flores e o sistema de visão de cores dos polinizadores foram selecionados durante o processo evolutivo de forma que os visitantes florais consigam distinguir as flores do plano de fundo, como os troncos e as árvores (Vorobyev e Brandt, 1997; Chittka *et al.*, 2001; Chittka e Raine, 2006). Além disso, os insetos polinizadores, como abelhas, besouros e moscas, tem um aparato sensorial capaz de perceber cores e cheiros, e associam estes atrativos, de forma inata ou a partir de aprendizado, à presença de recursos (Faegri e Pijl, 1979; Endress, 1994; Lunau e Maier, 1995; Kunze e Gumbert, 2001; Wright e Schiestl, 2009; Milet-Pinheiro *et al.*, 2012, 2013, 2015). Desta forma, flores que além de cor exalam odor podem aumentar a discriminação das cores pelos visitantes por melhorar a atenção para estímulos visuais, contribuindo para a formação da memória (Weiss, 1997; Kunze e Gumbert, 2001; Goyret *et al.*, 2008; Riffell *et al.*, 2013). Deste modo, a presença de atrativos é essencial para que haja visita de insetos, e atrativos primários, como o pólen, são inúteis ao menos que estejam acompanhados por um atrativo secundário (Faegri e Pijl, 1979). Além disso, distâncias curtas entre indivíduos de uma mesma espécie, como é verificado em todas as espécies de *Rhynchospora*, podem contribuir para garantir a constância de visitas por insetos em uma mesma espécie, que necessitam fazer menos esforço para encontrar o recurso floral (Chittka *et al.*, 1999).

A grande amplitude de insetos, que inclui três ordens, tais como Coleoptera, Diptera e Hymenoptera, que podem visitar as espécies de *Rhynchospora* e efetuar a polinização, indicam um sistema de polinização generalista. Resultado semelhante foi verificado por Wragg e Jonhson (2011) em que espécies de *Cyperus* foram visitados por abelhas e besouros. Assim como em *Rhynchospora*, as abelhas visitantes de *Cyperus* foram os visitantes mais efetivos na polinização, sendo capazes de carregar grande quantidade de pólen destas espécies de Cyperaceae (Wragg e Jonhson, 2011).

O fato destas espécies também apresentarem *pollenkitt* contribuiu para que o pólen grudasse no corpo dos insetos (Pacini e Hesse, 2005), principalmente das abelhas, considerado o grupo de insetos mais efetivos na realização de polinização cruzada nestas espécies de *Rhynchospora*. A partir disso, o pólen pode ser transportado a maiores distâncias pelos insetos que efetuam a polinização cruzada. Espécies anemófilas geralmente não apresentam *pollenkitt* (Crane, 1986; Ackerman, 2000; Wragg e Jonhson, 2011), o que diminui a possibilidade do pólen se agrupar (Crane, 1986; Pacini e Hesse, 2005). Segundo Niklas e Buchmann (1988) quando o pólen é liberado da antera de forma agrupada, ele permanece menos tempo no ar, ou seja, se assenta mais rapidamente do que o pólen quando liberado de

forma unitária. Portanto, a presença de *pollenkitt* pode não favorecer a polinização pelo vento a longa distância. Contudo, todas as espécies de *Rhynchospora* analisadas, independente da síndrome ou sistema de polinização, apresentaram alta razão pólen/óvulo e os indivíduos da população de cada espécie estavam bastante próximos uns dos outros, um pré-requisito considerado importante para ocorrer a polinização pelo vento (Whitehead, 1983; Costa *et al.*, em prep.; Capítulo 4 da tese).

A alta razão pólen/óvulo (P/O) presente em *Rhynchospora* é uma característica mantida no grupo e também presente em *Cyperus*, como verificado por Wragg e Jonhson (2011). A quantidade de pólen por óvulo maior que 20000 está dentro do esperado para espécies anemófilas de Cyperaceae e Poaceae (Wragg e Jonhson, 2011). Contudo, Cruden (1977) considera a razão P/O nesses grupos baixa, quando comparado com outras espécies anemófilas, que podem apresentar cerca de 60000 grãos de pólen por óvulo. Ainda, segundo Ackerman (2000), espécies anemófilas podem ultrapassar 1000000 de pólen por óvulo.

A presença de atributos anemófilos em espécies de *Rhynchospora*, mesmo em espécies que são polinizadas predominantemente por insetos pode ser considerado vantajoso. A polinização pelo vento pode ocorrer na ausência de polinizadores bióticos, sendo assim uma vantagem seletiva a manutenção destes caracteres (Linder, 1998). Além disso, a ambofilia, verificada neste estudo em cerca de 70% das espécies de *Rhynchospora*, pode ser mantida em casos em que tanto o vento quanto os insetos formam maior quantidade de frutos juntos do que quando atuam de maneira independente (Culley *et al.*, 2002; Costa e Machado, 2012), ou quando um dos vetores pode não ser tão eficiente devido as condições ambientais ou localização da planta no ambiente (Costa *et al.*, em prep.; capítulos 3 e 4 da tese), havendo vantagem evolutiva em manter ambos os vetores de polinização.

A partir deste estudo verificamos que diferentes atributos florais podem favorecer a polinização abiótica e biótica, formando um gradiente transicional em flores e inflorescências de *Rhynchospora*. Neste gradiente constatamos que caracteres anemófilos estão presentes no gênero, porém diversas espécies apresentam estruturas com funções atrativas para insetos polinizadores, ocorrendo ambofilia na maioria (cerca de 70%) das espécies, havendo até adaptação completa para a entomofilia, como verificado para *R. consanguinea*, *R. latifolia* e *R. speciosa*.

Esta classificação, a partir dos atributos florais e reprodutivos em *Rhynchospora*, criando um gradiente de espécies anemófilas > ambófilas > entomófilas pode servir como base para classificação de outras espécies pertencentes a diversos gêneros e famílias

essencialmente anemófilos em diferentes síndromes de polinização, envolvendo, em diferentes gradações, a participação de vetores bióticos.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Anete Lourenço e MSc. Darliana Fonseca da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri por todo apoio para realização da pesquisa, em Diamantina, Minas Gerais. Ao Prof. Dr. Loran Anderson, ao Dr. Christopher E. Buddenhagen e ao Prof. Dr. Russell Juelg pela ajuda nos trabalhos de campo, nos Estados Unidos. À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de doutorado (IBPG-0452-2.05/10) e bolsa de mobilidade discente (AMD01372.00/14) para ACGC, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) (99999.008144/2014-01) em New York, Estados Unidos, para ACGC, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro parcial (Edital Universal 459485/2014-8) e pela bolsa de produtividade para ICM; ao National Science Foundation (DEB-0946618) para WWT pelo auxílio para os estudos de campo.

LITERATURA CITADA

- Ackerman JD. 2000.** Abiotic and pollen and pollination: ecological, functional, and evolutionary perspectives. *Plant Systematic and Evolution* **222**: 167-185.
- Blight MM, Métayer ML, Delègue MP, Pickett JA, Marion-Poll F, Wadhams LJ. 1997.** Identification of floral volatiles involved in recognition of oilseed rape flowers, *Brassica napus* by Honeybees, *Apis mellifera*. *Journal of Chemical Ecology* **23**: 1715-1727
- Bowker JE, Crenshaw HC. 2007a.** Electrostatic forces in wind-pollination, Part 1: measurement of the electrostatic charge on pollen. *Atmospheric Environment* **41**: 1587-1595.
- Bowker JE., Crenshaw HC. 2007b.** Electrostatic forces in wind-pollination, Part 2: Simulations of pollen capture. *Atmospheric Environment* **41**: 1596-1603.
- Buddenhagen CE., Thomas WW, Mast AR. (no prelo).** A First Look at Diversification of Beaksedges (Tribe Rhynchosporaeae: Cyperaceae) in Habitat, Pollination, and Photosynthetic Features. *Memoirs New York Botanical Garden*.
- Chittka L, Thomson JD, Waser NM. 1999.** Flower Constancy, Insect Psychology, and Plant *Evolution Naturwissenschaften* **86**: 361-377.

2001.Chapter: Pp. 106-126.

Chittka L, Spaethe J, Schmidt A, Hickelsberger, A. 2001. Adaptation, constraint, and chance in the evolution of flower color and pollination color system. In: Chittka L, Thompson JD, eds. *Cognitive ecology of Pollination*. Cambridge: Cambridge University Press, 106-126.

Chittka L, Raine NE. 2006. Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 428-435.

Costa ACG, Machado IC. 2012. Flowering dynamics and pollination system of the sedge *Rhynchospora ciliata* (Vahl) Kük. (Cyperaceae): does ambophily enhance its reproductive success? *Plant Biology* **14**: 881-887.

Cox PA. 1991. Abiotic pollination: an evolutionary escape for animal-pollinated angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **333**: 217–224.

Crane PR. 1986. Form and function in wind dispersed pollen. In: Blackmore S, Ferguson IK. eds. *Pollen and Spores: Form and Function*. Academic, London, 179-202.

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

Culley TM, Weller SG, Sakai AK. 2002. The evolution of wind pollination in angiosperms. *Ecology & Evolution* **17**: 361-369.

Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PF. 1985. *The families of the monocotyledons: structure, evolution and taxonomy*. Berlin: Springer-Verlag.

Dafni A, Pacini E, Nepi M. 2005. Pollen and stigma biology. In: Dafni A, Kevan PG, Husband BC. eds. *Practical pollination biology*. Ontario: Editora Enviroquest L.T.D.

Dobson HEM, Bergström G. 2000. The ecology of pollen odors. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 63-87

Dobson HEM. 2006. Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator. In: Dudareva N, Pichersky E. eds. *Biology of floral scent*. Boca Raton: CRC Press. pp 147-198.

Dötterl S, Jürgens, A. 2005. Spatial fragrance patterns in flowers of *Silene latifolia*: Lilac compounds as olfactory nectar guides? *Plant Systematics and Evolution* **255**: 99–109

Dötterl S, Vereecken JN. 2010. The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: a review and perspectives. *Canadian Journal of Zoology* **88**: 668-697

Dudareva N, Pichersky E. 2006. *Biology of Floral Scent*. Boca Raton: Taylor & Francis Group.

Endress PK. 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Faegri K, Pijl L. 1979.** *The principles of pollination ecology*. 3 ed. Oxford: Pergamon Press.
- Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR, Thomson JD. 2004.** Pollination Syndromes and Floral Specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **35**: 375 -403
- Friedman J, Harder LD. 2004.** Inflorescence architecture and wind pollination in six grass species. *Functional Ecology* **18**: 851-860.
- Goyret J, Pfaff M, Raguso R, Kelber A. 2008.** Why do *Manduca sexta* feed from white flowers? Innate and learnt color preferences in a hawkmoth. *Naturwissenschaften* **95**: 569–576.
- Knudsen JT, Eriksson R, Gershenzon J, Ståhl B. 2006.** Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review* **72**: 1-120
- Kunze J, Gumbert A. 2001.** The combined effect of color and odor on flower choice behavior of bumble bees in flower mimicry systems. *Behavioral Ecology* **12**: 447-456.
- Leppik EE. 1955.** *Dichromena ciliata*, a noteworthy entomophilous plant among Cyperaceae. *American Journal of Botany* **42**: 455- 458.
- Linder HP. 1998.** Morphology and the evolution of wind pollination. In: Owens SJ, Rudall PJ. eds. *Reproductive biology in systematics, conservation and economic botany*. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Lucero LE, Vegetti AC. 2012** Inflorescence structure in *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). *Flora* **207**:47–56.
- Lucero LE, Vegetti AC, Reinheimer R. 2014.** Evolution and development of the spikelet and flower of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *International Journal of Plant* **175**: 186-201.
- Lunau K, Maier EJ. 1995.** Innate color preferences of flower visitors. *Journal of Comparative Physiology* **177**: 1-19.
- Maêda JM. 1985.** *Manual para uso da câmara de Newbauer para contagem de pólen de espécies florestais*. Departamento de Silvicultura, UFRJ, Recife.
- Magalhães AF, Ruiz ALTG, Flach A, Faria AD, Magalhães EG, Amaral MCE. 2005.** Floral scent of *Eleocharis elegans* (Kunth) Roem. & Schult. (Cyperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **33**: 675-679.
- Mangla Y, Gupta CK. 2015.** Love in the Air: Wind Pollination Ecological and Evolutionary Considerations. In: Kapoor R, Kaur I, Kaul M. eds. *Plant Reproductive Biology and Conservation*. Delhi: I K International, pp.234-244.

- Milet-Pinheiro P, Ayasse M, Schlindwein C, Dobson HEM, Dötterl S. 2012.** Host location by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee: innate and learned behavior. *Behavioral Ecology* **23**: 531-538
- Milet-Pinheiro P, Ayasse M, Dobson HEM, Schlindwein C, Francke W, Dötterl S. 2013.** The chemical basis of host-plant recognition in a specialized bee pollinator. *Journal of Chemical Ecology* **39**: 1347–1360
- Milet-Pinheiro P, Ayasse M, Dötterl S. 2015.** Visual and olfactory floral cues of *Campanula* (Campanulaceae) and their significance for host recognition by an oligolectic bee pollinator. *Plos One* **10**: e0128577
- Niklas KJ, Buchmann S. 1988.** Aerobiology and pollen capture in orchard-grown *Pistacia vera* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany* **75**: 1813-1829.
- Pacini E, Hesse M. 2005.** Pollenkitt – its composition, forms and functions. *Flora* **200**: 399-415
- Proctor M, Yeo P, Lack A. 1996.** *The natural history of pollination*. London: Harper Collins Publishers.
- Raguso RA. 2004.** Why do flowers smell? - The chemical ecology of fragrance-driven pollination. In: Cardé RT, Millar JG. eds. *Advances in Insect Chemical Ecology*. Cambridge: Cambridge University Press. pp 151-178.
- Raguso R. 2008.** Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **39**: 549-569.
- Regal PJ. 1982.** Pollination by wind and animals: ecology of geographic patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**: 497-524.
- Riffell JA, Lei H, Abrell L, Hildebrand JG. 2013.** Neural basis of a pollinator's buffet: Olfactory specialization and learning in *Manduca sexta*. *Science* **399**: 200–204.
- Rosas-Guerrero V, Aguilar R, Martén-Rodríguez S, Ashworth L, Lopezaraiza-Mikel M, Bastida JM., Quesada M. 2014.** A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecology Letters* **17**: 388–40.
- Roy BA, Raguso RA. 1997.** Olfactory versus visual cues in a floral mimicry system. *Oecologia* **109**: 414-426.
- Shuttleworth A, Johnson SD. 2009.** The importance of scent and nectar filters in a specialized wasp-pollination system. *Functional Ecology* **23**: 931-940.
- Strong MT. 2006.** Taxonomy and distribution of *Rhynchospora* (Cyperaceae) in the Guianas, South America. *Contributions from the United States National Herbarium* **53**: 1–225.

- Thomas WW. 1984.** The systematics of *Rhynchospora* section *Dichromena*. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **37**: 1-116.
- Vorobyev M, Brandt R. 1997.** How do insect pollinators discriminate colors? *Israel Journal of Plant Sciences* **45**: 103-113
- Vogel S. 1990.** *The role of scent glands in pollination*. Washington: Smithsonian Institution Libraries.
- Weiss MR. 1997.** Innate color preferences and flexible color learning in the pipevine swallowtail. *Animal Behaviour* **53**: 1043– 1052.
- Whitehead DR. 1983.** Wind pollination: some ecological and evolutionary perspectives. In: Real L. (ed.). *Pollination Biology*. Orlando: Academic Press.
- Wragg PD, Johnson SD. 2011.** Transition from wind pollination to insect pollination in sedges: experimental evidence and functional traits. *New Phytologist* **191**: 1128-1140.
- Wright GA, Schiestl FP. 2009.** The evolution of floral scent: the influence of olfactory learning by insect pollinators on the honest signaling of floral rewards. *Functional Ecology* **23**: 841–851.

Lista de tabelas

Tabela 1. Lista de espécies estudadas, organizadas por ecossistemas (ECO) em que foram estudadas, características florais, tais como número de flores por espiguetas (NF), sistema sexual (SS), Razão pólen/óvulo (P/O), Tamanho da espiguetas (T. ESP.), Tamanho dos estames em antese (T. EST.) e Tamanho do gineceu (T. G.) das espécies de *Rhynchospora* (Vahl) estudadas e registro de depósito nos Herbários dos espécimes-testemunho.

Eco	Espécies	NF	SS	P/O	T. ESP.	T. EST. ¹	T.G. ²	Vouchers
Floresta Atlântica	<i>Rhynchospora barbata</i>	1	B	15,000.4 ± 1243.2	3.7 ± 1.1	4 ± 0.	5.5 ± 1.2	UFP 76.543
	<i>R. cephalotes</i>	4-8	B	11,240.4 ± 292.7	8.4 ± 0.65	7.9 ± 1.2	8.7 ± 0.92	UFP 76.542
	<i>R. ciliata</i>	10-15	B	33,654 ± 1,243.68	6.4 ± 2.25	6 ± 0.8	6.4 ± 0.2	UFP 76.545
	<i>R. pubera</i>	5-9	B	20,892.3 ± 1,329	7 ± 1.3	5.8 ± 0.6	6 ± 0.2	UFP 76.544
Campo Rupestre	<i>R. albiceps</i>	2	A	8,701.1 ± 468.9	5.5 ± 0.7	7.3 ± 2.2	9.2 ± 1.1	UFP 77.657
	<i>R. consanguinea</i>	5-7	A	7,585.6 ± 1842.4	3.7 ± 0.6	6 ± 0.4	5.5 ± 1.2	UFP 77.662
	<i>R. dissitispicula</i>	2	B	25,125.2 ± 721.3	6.1 ± 0.3	6.5 ± 0.3	6 ± 0.85	UFP 77.663
	<i>R. elatior</i>	5	B	18,065.8 ± 986.5	7.2 ± 0.6	10.4 ± 0.3	12.5 ± 0.2	UFP 77.655
	<i>R. globosa</i>	2-5	A	16520.3 ± 734.6	8.52 ± 0.8	14 ± 0.4	19 ± 2.5	UFP 77.659
	<i>R. setigera</i>	2	A	5,833 ± 765.3	4.3 ± 0.8	6.9 ± 0.3	6.5 ± 0.4	UFP 77.658
	<i>R. speciosa</i>	6-8	A	5,000 ± 2130.5	4.1 ± 0.5	6.5 ± 0.2	5 ± 1.3	UFP 77.656

	<i>R. riedeliana.</i>	4-6	A	12.000±648.2	9.7±3.1	10.1±4.2	12.5±2.5	UFP
	<i>Rhynchospora sp.</i>	2	B	22,500 ± 750	4.43±0.3	5.5±0.2	5.3±1.2	UFP
Floresta de Pinus	<i>R. alba</i>	2-3	B	5,890 ± 564.4	5 ± 0.3	5.2 ± 1.7	5 ± 0.33	NYBG A.Costa 145
	<i>R. latifolia</i>	5-7	B	20,000±321.67	4.7 ± 0.3	4.3 ± 1.2	6 ± 0.2	NYBG A. Costa 146
	<i>R. pallida</i>	2-3	B	5,248.2 ± 658.3	6.3 ± 0.5	5.3 ± 1.3	5.9 ± 0.9	NYBG W. Thomas 16487

1= filete + antera , 2= ovário + estilete + estigma

Tabela 2. Presença e ausência de atributos florais em espécies de *Rhynchospora* (Vahl) associados à anemofilia (anemo) e entomofilia (ento). AB: Antera branca AF: Atributos florais; AM: Antera amarela; BFA: Bráctea floral amarela/laranja; BFB: Bráctea floral branca BFL: Bráctea floral laranja; BFM: Bráctea floral marrom; BFV: Bráctea floral verde; BIBP: Bráctea involucral com mancha branca pequena; BIBM: Bráctea involucral com mancha branca média; BIBG: Bráctea floral com mancha branca grande; BIVA: Bráctea floral verde ou ausente; ICP: Inflorescência capítulo parcial; ICU: Inflorescência capítulo único; IP: Inflorescência panícula; EO: Emissão de odor.

	AF	<i>R. dissitispicula</i>	<i>R. barbata</i>	<i>R. cephalotes</i>	<i>R. riedeliana</i>	<i>Rhynchospora sp.</i>	<i>R. globosa</i>	<i>R. elatior</i>	<i>R. setigera</i>	<i>R. alba</i>	<i>R. pallida</i>	<i>R. pubera</i>	<i>R. albiceps</i>	<i>R. ciliata</i>	<i>R. consanguinea</i>	<i>R. latifolia</i>	<i>R. speciosa</i>
Anemo	IP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BFV	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BFM	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	BIVA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	AM	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
Ento	ICU	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
	ICP	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	BFA	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BFB	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
	BIBP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	BIBM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
	BIBG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	AB	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
	EO	1	0	1	1	1	1	1	1	-	-	-	1	-	1	-	1

Tabela 3. Porcentagem média e desvio padrão dos principais compostos voláteis, organizados pelo índice de retenção (IR), emitidos pelas flores de 10 espécies de *Rhynchospora* (Vahl).

Compostos	IR	R. <i>albiceps</i>	R. <i>barbata</i>	R. <i>cephalotes</i>	R. <i>consanguinea</i>	R. <i>dissitispicula</i>	R. <i>elator</i>	R. <i>globosa</i>	R. <i>riedeliana</i>	R. <i>setigera</i>	R. <i>speciosa</i>	<i>Rhynchospora</i> sp.
α -Pinene	938	-	-	-	-	27.7 $\pm$ 22.3	-	-	-	-	-	-
1-Octen-3-ol	985	-	-	-	-	72.3 $\pm$ 22.3	-	14.8 $\pm$ 14.9	-	-	-	-
Myrcene	995	-	-	-	8.8 $\pm$ 3.2	-	-	-	-	-	-	7.6 $\pm$ 4.4
(Z)-3-Hexenyl acetate	1010	44.9 $\pm$ 18.4	-	-	11.9 $\pm$ 4.8	-	-	-	-	-	-	-
d-3-carene	1008	-	-	15 $\pm$ 13.8	-	-	-	-	-	-	-	-
Limonene	1029	-	-	7.6 $\pm$ 6	-	-	-	-	-	-	-	-
Sylvestrene	1028	-	-	-	1.8 $\pm$ 1.6	-	6.8 $\pm$ 7.6	-	-	15.9 $\pm$ 19.3	-	-
(Z)- β -Ocimene	1040	9.4 $\pm$ 6.3	-	-	11.7 $\pm$ 5.5	-	4.4 $\pm$ 2.7	17.6 $\pm$ 13	16.4 $\pm$ 3.8	-	-	12.6 $\pm$ 13.6
(E)- β -Ocimene	1051	18.2 $\pm$ 9.9	-	-	9.2 $\pm$ 4.6	-	45.8 $\pm$ 15.93	14.6 $\pm$ 6.2	24.4 $\pm$ 9.6	6.1 $\pm$ 8.6	10.1 $\pm$ 12.3	8.5 $\pm$ 4.0
7-Methyl-1,6-dioxaspiro(4,5)decane	1060	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0 $\pm$ 0.6	-	-
Linalool	1101	2.5 $\pm$ 2.2	-	-	4.6 $\pm$ 5.9	-	-	-	-	32.4 $\pm$ 14.5	22.9 $\pm$ 21.73	4.0 $\pm$ 3.5
2-Phenylethanol	1118	-	-	49.1 $\pm$ 41.7	-	-	-	-	-	5.4 $\pm$ 2.4	-	-
(E)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatriene	1119	12.2 $\pm$ 6.9	-	-	32.4 $\pm$ 18.8	-	12.7 $\pm$ 12.6	26.7 $\pm$ 18.2	18.2 $\pm$ 10.8	12.0 $\pm$ 3.3	66.9 $\pm$ 33.6	41.2 $\pm$ 19.1
Alloocimene	1132	8.3 $\pm$ 4	-	-	14.9 $\pm$ 7.8	-	3.6 $\pm$ 2.5	18.8 $\pm$ 8.8	19.2 $\pm$ 3.5	-	-	13.7 $\pm$ 10.6
neo-Alloocimene	1144	4.2 $\pm$ 2.1	-	-	4.4 $\pm$ 2.7	-	-	7.3 $\pm$ 2.4	7.0 $\pm$ 4.0	-	-	5.3 $\pm$ 4.9
Methyl salicylate	1196	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.1 $\pm$ 3.8
Phenyl ethyl acetate	1254	-	-	28.1 $\pm$ 33.4	-	-	-	-	-	-	-	-
β -Elemene	1395	-	-	-	-	-	-	-	-	26.9 $\pm$ 9.0	-	-
Sesquiterpene 1	1399	-	-	-	-	-	12.7 $\pm$ 13.1	-	10.4 $\pm$ 2.2	-	-	-
Sesquiterpene 2	1505	-	-	-	-	-	5.2 $\pm$ 4.4	-	-	-	-	-
Sesquiterpene 3	1528	-	-	-	-	-	8.4 $\pm$ 5.3	-	4.1 $\pm$ 0.8	-	-	-
Sesquiterpene 4	1583	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-2.6 $\pm$ 2.1

Ausência:-

Tabela 4. Sucesso reprodutivo (%) nos tratamentos de autopolinização espontânea, polinização pelo vento e polinização natural em espécies de *Rhynchospora*, organizadas das com inflorescências e flores mais inconspícuas para as mais conspícuas, estudadas em áreas de mata Atlântica*, em Pernambuco e Paraíba, e de Campo Rupestre**, em Minas Gerais, Brasil.

Espécies	AE	PV (+ AE)	PN (AE + PV + PI)
<i>R. dissitispicula</i> **	24 ^a	81.08 ^b	73.07 ^b
<i>R. barbata</i> *	21.05 ^a	90.90 ^b	85 ^b
<i>R. cephalotes</i> *	6.66 ^a	53.33 ^b	93.33 ^c
<i>R. globosa</i> **	11.42 ^a	47.82 ^b	100 ^c
<i>R. elatior</i> **	6 ^a	29.09 ^b	76.47 ^c
<i>R. pubera</i> *	23.2 ^a	44.8 ^b	93.5 ^c
<i>R. setigera</i> **	14.70 ^a	30.78 ^a	78.94 ^b
<i>R. albiceps</i> **	12.5 ^a	36.66 ^b	72.97 ^c
<i>R. ciliata</i> *	3 ^a	37.5 ^b	85.10 ^c
<i>R. consanguinea</i> **	40.90 ^a	37.71 ^a	100 ^b
<i>R. speciosa</i> **	15.94 ^a	6.89 ^a	66.66 ^b

Letras diferentes representam diferenças significativas em uma mesma linha ($p < 0.05$). AE = Autopolinização espontânea; PV= Polinização pelo vento; PN= Polinização natural; PI= polinização por insetos.

Tabela 5. Visitantes florais e frequência de visitas (%) de espécies ambófilas e entomófilas de *Rhynchospora* em Floresta Atlântica e Campo Rupestre no Brasil, e Florestas de *Pinus*, nos Estados Unidos.

	Floresta Atlântica				Campo Rupestre				Floresta de Pinus			
	R.	R.	R.	R.	R.	R.	R.	R.	R.	R.	R.	R.
Visitantes florais / Espécies entomófilas	<i>cephalotes</i>	<i>ciliata</i>	<i>pubera</i>	<i>albiceps</i>	<i>consanguinea</i>	<i>elator</i>	<i>globosa</i>	<i>setigera</i>	<i>speciosa</i>	<i>alba</i>	<i>latifolia</i>	<i>pallida</i>
HYMENOPTERA												
Apidae												
<i>Apis mellifera</i>	-	-	-	14.28	38.3	10.7	-	16.36	2.59	-	-	-
<i>Bombus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	100
<i>Frieseomelitta doederleini</i>	-	26.3	15.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Plebeia droryana</i>	-	14	29.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Plebeia</i> sp.	58.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trigona spinipes</i>	21.2	54.3	41.3	9.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Halictidae												
<i>Augochloropsis</i> sp.	-	5.2	13.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lasioglossum</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90	-
Halictidae sp. 1	19.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Halictidae sp. 2	-	-	-	38.1	23.4	14.2	13.6	23.63	6.49	-	-	-
Halictidae sp. 3	-	-	-	19	-	8.9	4.5	5.45	-	-	-	-

COLEOPTERA**Cetoniidae**

<i>Chlorocala</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	58.4	-	-	-
-----------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	------	---	---	---

Chrysomelidae

<i>Diabrotica</i> cf. <i>undecimpunctata</i>	-	-	-	-	31.9	35.7	29.5	38.18	14.28	-	-	-
--	---	---	---	---	------	------	------	-------	-------	---	---	---

<i>Tricholochmaea</i> sp.	-		-	14.2	4.2	8.9	11.3	9.1	16.8	-	-	-
---------------------------	---	--	---	------	-----	-----	------	-----	------	---	---	---

Chrysomelidae sp. 1	-	-	-	-	-	1.7	4.5	-	1.29	-	-	-
---------------------	---	---	---	---	---	-----	-----	---	------	---	---	---

Chrysomelidae sp. 2	-	-	-	4.7	-	23.5	-	1.81	-	-	-	-
---------------------	---	---	---	-----	---	------	---	------	---	---	---	---

Chrysomelidae sp. 3	-	-	-	-	2.12	23.5	9.1	5.45	-	-	-	-
---------------------	---	---	---	---	------	------	-----	------	---	---	---	---

Chrysomelidae sp. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-
---------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	---

DIPTERA**Syrphidae**

<i>Syrphidae</i> sp.	-	-	-	-	-	12.5	27.27	-	-	-	-	-
----------------------	---	---	---	---	---	------	-------	---	---	---	---	---

Lista de Figuras

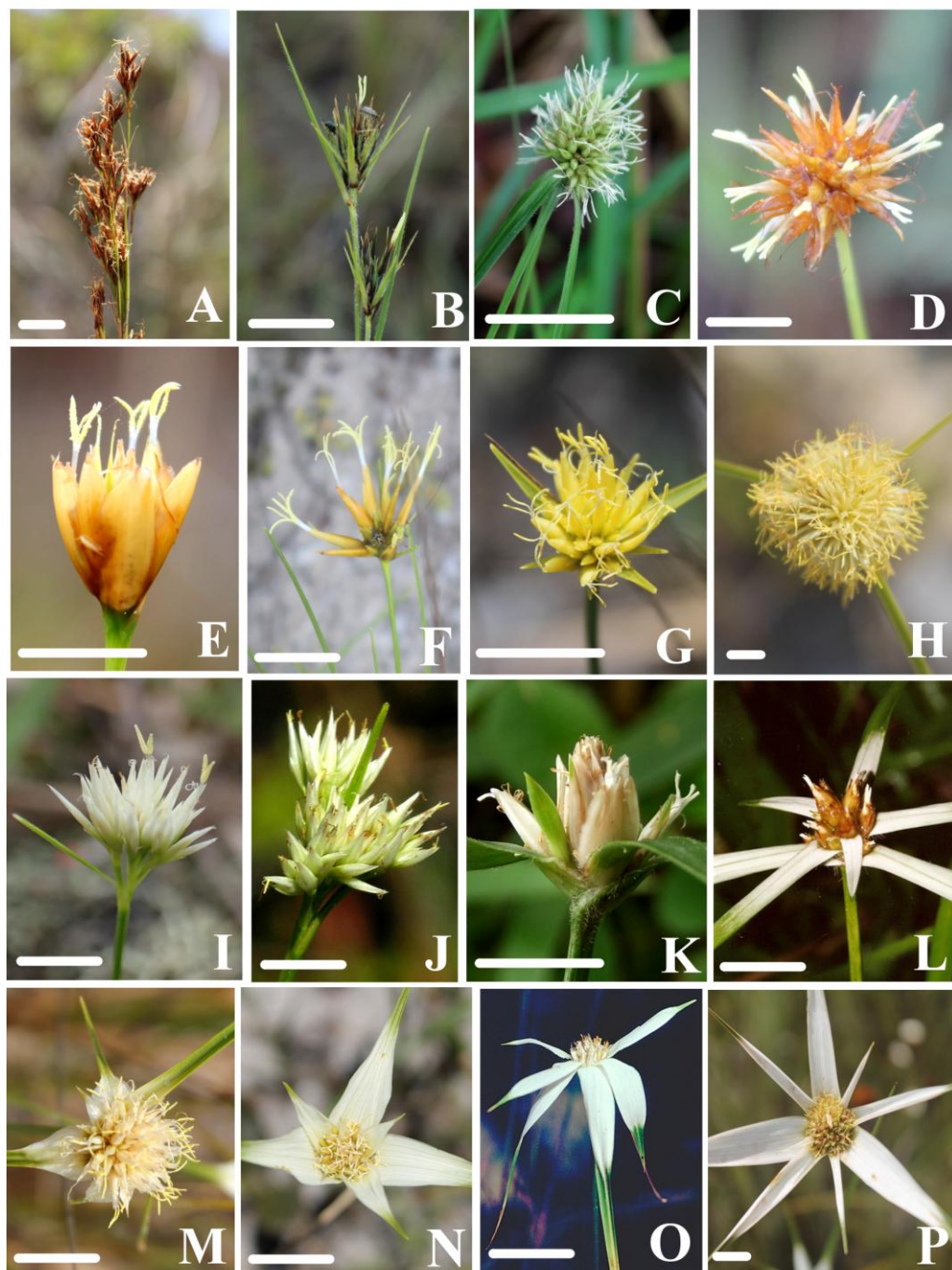


Figura 1. Gradiente de atributos florais encontrados em *Rhynchospora* (Vahl), incluindo desde espécies anemófilas, como *R. dissitispicula* (A), espécies com características ambófilas, intermediárias, tais como *Rhynchospora* sp. (B), *R. cephalotes* (C), *R. barbata* (D), *R. globosa* (E), *R. riedeliana* (F), *R. elatior* (G), *R. setigera* (H), *R. pallida* (I), *R. alba* (J), *R. pubera* (K), *R. ciliata* (L) até predominantemente entomófilas, tais como *R. albiceps* (M), *R. consanguinea* (N), *R. latifolia* (O), *R. ciliata* (O) e entomófila, como *R. speciosa* (P) (escala: 1cm).

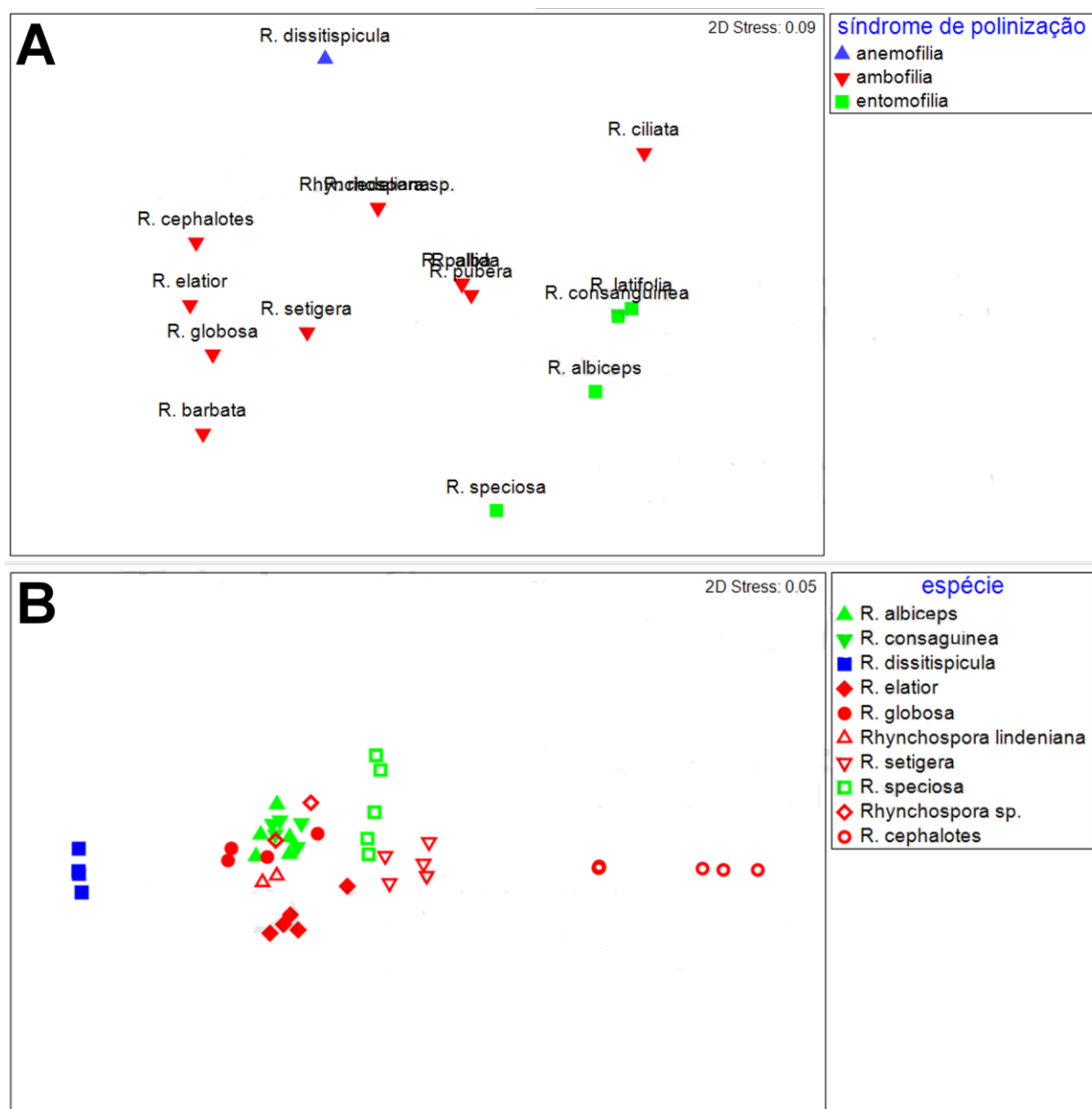


Figura 2. Análise de gradiente NMDS dos grupos de espécies de cada síndrome de polinização considerando os atributos florais associados com a polinização pelo vento e por insetos (A) e considerando a composição e quantidade de compostos emitidos por cada espécie de cada síndrome de polinização (B). Anemofilia: símbolos azuis, ambofilia: símbolos vermelhos, entomofilia: símbolos verdes.

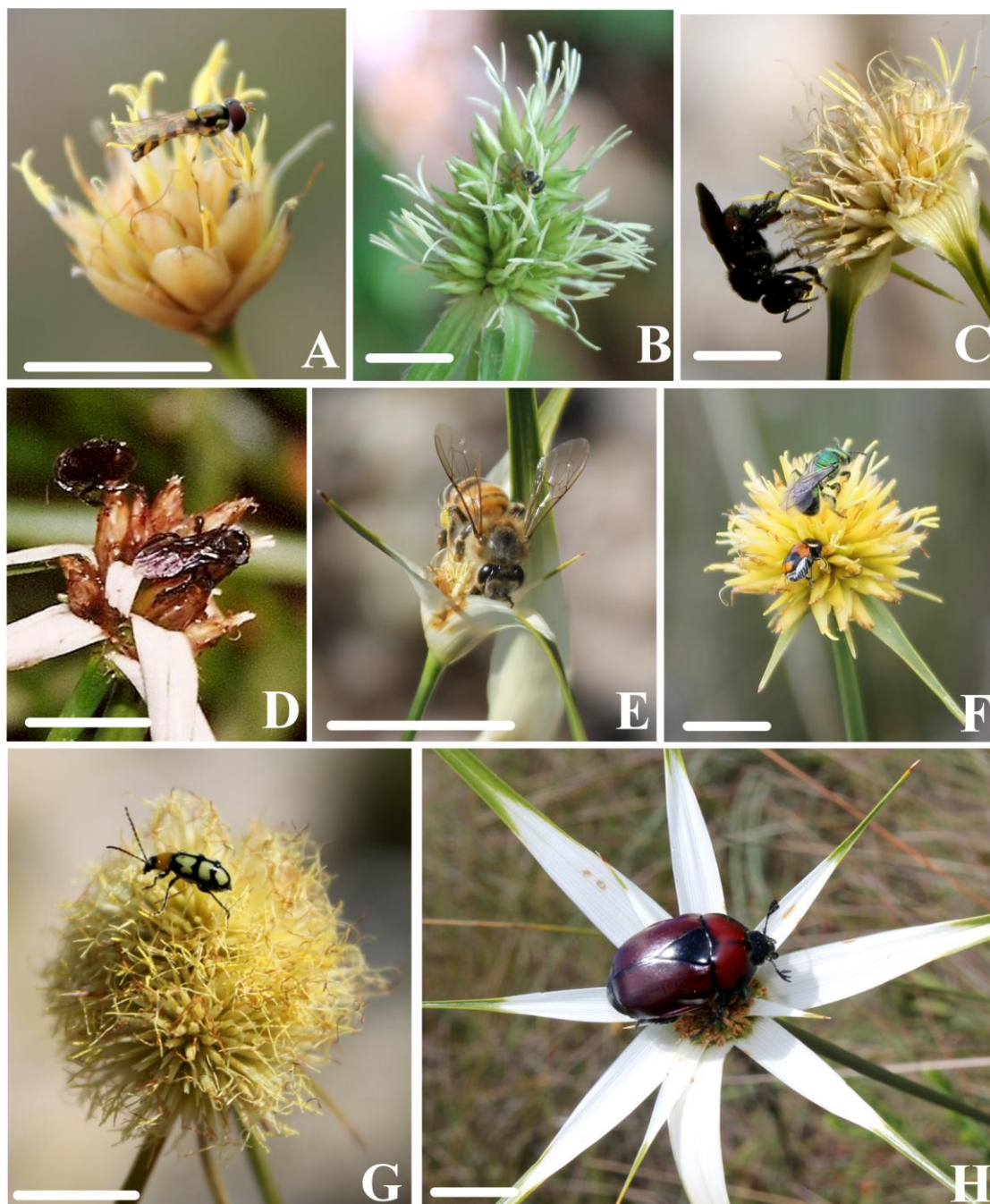


Figura 3. Visitantes florais de algumas espécies de *Rhynchospora* (Vahl). Mosca Syrphidae sp. em flores de *R. globosa* (A); Abelha *Plebeia* sp. visitando flores de *R. cephalotes* (B); abelha *Trigona spinipes* em flores de *R. albiceps* (C) e *R. ciliata* (D); *Apis mellifera* visitando flores de *R. consanguinea* (E); abelha Halictidae e besouro Chrysomelidae em flores de *R. elatior* (C); besouro *Diabrotica* cf. *undecimpunctata* visitando *R. setigera* (D), e besouro *Chlorocala* sp. em flores de *R. speciosa* (H) (escala: 1cm).

4 COMPARATIVE FLORAL BIOLOGY OF *RHYNCHOSPORA CILIATA* (VAHL) KUKENTH AND *R. PUBERA* (VAHL) BOECKELER (CYPERACEAE): THE ROLE OF WHITE INVOLUCRAL BRACTS IN ATTRACTING POLLINATING INSECTS

Ana Carolina Galindo Da Costa¹, William Wayt Thomas² and Isabel Cristina Machado¹

Role of white bracts in pollination

¹*Universidade Federal de Pernambuco, Botany Department, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Recife, Pernambuco, Brazil*

²*The New York Botanical Garden, Bronx, New York, U.S.A.*

Isabel Cristina Machado. Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. CEP 50372-970, Recife, Pernambuco, Brazil. E-mail imachado@ufpe.br, phone +55 (81) 2126-8845

Manuscrito publicado no periódico Plant Species Biology

ABSTRACT

Although Cyperaceae are considered anemophilous, some species exhibit features that are attractive to pollinators, such as the white UV-reflecting involucral bracts of *Rhynchospora ciliata*. But how effective are these conspicuous adaptations? To address this question, we tested the hypothesis that species such as *R. ciliata* are visited by greater number of pollinating insects than similar species with green involucral bracts, such as *R. pubera*. We compared the floral biology of both species, the number of visits to sympatric populations of each species, associating them with the availability of pollen and the pollination system. We verified that species with white involucral bracts are preferred, because there were more visits to *R. ciliata* in the first two hours the flowers were open. The peak visitation in *R. pubera* was two hours after the flowers opened, when the pollen of *R. ciliata* was exhausted. While the involucral bracts of *R. pubera* are green, the spikelet scales and anthers are white and reflect ultraviolet light. Overall, flowers of *R. pubera* exhibit less white or reflective surfaces, and are probably less conspicuous to a bee, than those of *R. ciliata*. It is possible that *R. pubera* is a second option for visitors after the first two hours of anthesis. The two different peaks in visitation minimize interspecific competition for pollinators, suggesting that *R. ciliata* and *R. pubera* together could attract more generalist pollinators and, instead of competing, facilitate the pollination of both species. Although *R. pubera* is autogamous and self-compatible, both wind and insects are important to its reproductive success.

Keywords: anemophily, attractiveness, entomophily, facilitation, *Rhynchospora*

INTRODUCTION

In angiosperms, during the transition from entomophily to anemophily many conspicuous floral structures, such as petals, were lost (Leppik 1955; Linder 1998). Anemophily is a plesiomorphic condition in the Cyperaceae characterized by floral traits considered not attractive to potential pollinators, such as small, greenish, and odourless flowers, as well as the absence of nectaries (Leppik 1955; Endress, 1994; Linder 1998; Ackerman 2000; Wragg & Johnson 2011). Nevertheless, a number of studies have shown that insects visit and pollinate the flowers of sedges, revealing that many species possess functional characteristics associated with entomophily. Therefore, in the reversion to pollination by insects, the function of pollinator attraction is often assumed by other structures than those lost in the earlier shift to anemophily (Leppik 1955; Thomas 1984a; Linder, 1998, Culley *et al.* 2002, Wragg & Johnson 2011; Costa & Machado 2012).

Among the features considered attractive to insect pollinators in Cyperaceae are white involuclal bracts subtending terminal inflorescences (Leppik 1955; Thomas 1984a; Araújo *et al.* 2012; Costa & Machado 2012); yellow involuclal bracts (Dahlgren *et al.* 1985); yellow spikelet scales, white spikelet scales or perigynia (Thomas 1984a, 1984b; Wragg & Johnson 2011); blue filaments (Dahlgren *et al.* 1985); intense yellow anthers (Leppik, 1955); and white anthers (Alves *et al.* 2002; Magalhães *et al.* 2005; Costa & Machado 2012). In this sense, Costa and Machado (2012) verified that the white involuclal bracts and the white anthers of *Rhynchospora ciliata* reflect ultraviolet light (UV), one of the components of trichromatic bee color vision (Chittka *et al.* 1994), and have hypothesized that the above-mentioned structures should play a role in attracting bees over longer distances, through the contrast with the background (Brito *et al.* 2014).

The transition from wind to insect pollination is very rare (Friedman 2011), and according to Wragg & Johnson (2011), there may have been more shifts from wind to insect pollination in the Cyperaceae than in all other angiosperm families combined. Studies on morphological attributes related to entomophily, as in species of *Rhynchospora*, may permit us to understand how characters considered attractive to pollinators arose, and to understand the evolutionary history in the group. White involuclal bracts, for instance, have arisen at least five separate times within *Rhynchospora* (Thomas 1984a). Furthermore, a study with experimental evidence of the contribution of pollen vectors to reproductive success of *Rhynchospora* could elucidate the importance of critical characters, such as white involuclal

bracts, involved in the transition between wind and insect pollination of related species, a question that is not yet fully understood (Friedman & Barrett 2009).

In this study, we examined floral morphology, the sequence of anthesis, pollen availability, and pollination systems in two species of *Rhynchospora* section *Dichromena*, *R. pubera* and *R. ciliata*. Both species have capitate inflorescences of white spikelets subtended by green involucre bracts (*R. pubera*) or pale brown spikelets subtended by white involucre bracts (*R. ciliata*). Data about floral morphology and dynamics of anthesis, pollen availability and pollination system for *R. ciliata* were obtained from Costa & Machado (2012), and data about number of visits of *R. ciliata* were taken at the same time it was did to *R. pubera* (from March through May of 2013). Finally here we tested the hypothesis that species with white involucre bracts present more insect visits than species with green involucre bracts.

MATERIALS AND METHODS

Species studied and study site

Rhynchospora ciliata and *R. pubera* are widespread tropical American species of Cyperaceae, native to Brazil (Alves *et al.* 2014) that flower continually throughout the year. In both species, the inflorescence is a terminal capitulum of 4–16 inconspicuous spikelets, each of which is 7–9 mm long, (white in *R. pubera* and pale greenish to brown at maturity in *R. ciliata*), with the whole capitulum subtended by 3–7 involucre bracts that exceed the inflorescence. While both species have white anthers, in *R. pubera* the involucre bracts are green, and in *R. ciliata* they are white (Thomas 1984a; Fig. 1). Flowers of both species have similar morphology, with each flower subtended by a spikelet scale, lacking sepals and petals, and comprising three stamens, each with a filament and an anther with irregular longitudinal dehiscence, and a pistil comprising a unilocular ovary and a style terminating in a bifid stigma (Fig. 2).

Costa & Machado (2012) verified that the white involucre bracts and the anthers of *R. ciliata* reflect UV light. The flowers of this species have four phenophases in hermaphroditic flowers: bud, functional flower with filaments and style elongated, non-functional flower, and fruit. In each inflorescence, only one flower of each spikelet opened per day; anthesis started around 06:30 h with simultaneous elongation of the filaments and style; about 08:00 h the anthers had dehisced and the stigma was receptive; whereas by 11:00 h the anthers were already empty, desiccated, and starting to fall. *Rhynchospora ciliata* has $36,875 \pm 3472$ pollen grains per flower and about 80% of the pollen is liberated from the anthers in the first two

hours after anther dehiscence. Furthermore, this species is self-incompatible and requires wind or bees as pollination agents (Costa & Machado 2012). More data on the floral biology, anthesis dynamics, and reproductive biology of *R. ciliata* can be found in Costa & Machado (2012).

Field observations took place from March through May of 2013 in natural populations of both species along the forest edges of the Parque Estadual Dois Irmãos, a 367 ha Atlantic coastal moist forest remnant in Recife, Pernambuco (08°07'S, 34°52'W) in northeastern Brazil. The two populations are ca. 30 m apart and roughly equivalent in size (7–8 m²). There were about 28–35 floral scapes per m² in each populations. Although there were other species of plants with flowers in this community, the pollinators of *R. ciliata* and *R. pubera* rarely visited other flowers. Voucher specimens of each species were collected and deposited in the Herbário UFP - Geraldo Mariz, of the Universidade Federal de Pernambuco (A.C.G. Costa 130, UFP sheet no. 76.545 for *R. ciliata* and A.C.G. Costa 131, UFP sheet no. 76.544 for *R. pubera*).

Floral biology and anthesis dynamics of Rhynchospora pubera

To enable a comparison with *Rhynchospora ciliata*, the morphology of the inflorescences and flowers of *R. pubera* were analyzed and classified in the four phenophases according to the protocols established in Costa & Machado (2012): bud, functional flower, nonfunctional flower, and fruit.

In order to ensure that there are no differences in the number of visits between *Rhynchospora pubera* and *R. ciliata* due to distinction in the process of anthesis we verified the time, sequence and duration of anthesis on three consecutive days, from 06:30 h to 13:00 h, for ten individuals of each species. Stigma receptivity was monitored for ten flowers, one on each of ten different individuals, from the beginning of anthesis, at 06:30 h, to the end of anthesis, at 13:00 h, using hydrogen peroxide (Dafni *et al.* 2005) as an indicator of receptivity. To detect the presence of osmophores (glands emitting fragrance), the green involucral bracts and the spikelet scales of some individuals were immersed in a solution of neutral red (1:1000; Vogel 1990) and the location of any reactions to the dye observed.

Because the white involucral bracts and anthers of *Rhynchospora ciliata* reflect UV light (Costa & Machado 2012), we also observed whether the involucral bracts, inflorescences, including the anthers, of *R. pubera* reflect UV light by viewing them in a UV light chamber (Tecnal Io: TE-540, Piracicaba, Brazil).

To ensure that pollen grains can freely traverse the mesh tissue that prevents floral visitors accessing flowers in the select exclusions experiment, pollen grain sizes of *Rhynchospora pubera* and *R. ciliata* were measured. We used an ocular micrometer adapted to an optical microscope and took 10 measurements of the polar (P) and equatorial axes (E) in different pollen grains from 10 individuals.

Test of attractiveness to floral visitors

To test the hypothesis that species with white involucre bracts attract more insects than species with green involucre bracts, we compared the average frequency of visits to ten individuals each of *Rhynchospora ciliata* and *R. pubera* that had the same number of open flowers. Observations were made from 07:00 h to 13:00 h. The proximity of the populations (ca. 30 m apart) minimized environmental differences that could affect the results. These observations were repeated six times, for a total of 36 hours of observation of each species. While it is possible that pollination of these two species may be different in other situations, we were fortunate to be able to compare the two species in a natural habitat where they occur sympatrically and are visited by native pollinators.

The number of visits to the flowers of each species, and the time of each visit were recorded from 08:00 h to 12:00 h. Differences between the mean number of visits to *R. ciliata* and *R. pubera* in both periods were analyzed using a t-test, with $\alpha = 0.05$ (BioEstat 5.0; Ayres *et al.* 2007). Flower visitors were captured using large-mouthed containers and then dry mounted in the Laboratory of Floral and Reproductive Biology of Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. The insects were identified by comparison with previously collected insect visitors to *R. ciliata* that had been identified by specialists.

Pollen availability

To verify how much pollen of *Rhynchospora pubera* is available to visiting bees during anthesis, ten anthers from different flowers of different inflorescences were collected every two hours and stored in a solution of 1 ml of lactic acid and glycerin (3:1). Afterwards, the pollen grains were counted using a Neubauer chamber on a stereomicroscope (Maêda 1985). For anthers collected during the last hour, the pollen grains were counted manually because there were fewer than 2000 grains per anther. Pollen availability was associated with the average number of visits. For *R. ciliata*, this same analysis was carried out by Costa & Machado (2012). The results from that study are compared and discussed here. The significance of differences in the average number of pollen grains present in *R. ciliata* and in

R. pubera at 10:00 h was verified using a t-test, $\alpha = 0.05$ (Ayres *et al.* 2007). Finally, we tested for the presence/absence of pollenkitt (Dafni *et al.* 2005), in order to verify the putative adhesion of pollen grains of both analyzed species to floral visitors.

Pollination systems

To determine the pollination system of *Rhynchospora pubera*, we carried out pollen vector exclusion experiments in order to understand the contribution of each vector to fruit formation. We followed the protocols described in Costa & Machado (2012) for the experiments performed on *R. ciliata*. Eight inflorescences from different individuals, randomly selected, were used in each treatment to test: (1) Spontaneous self-pollination—inflorescences were covered with a paper bag to exclude both wind and insects; (2) Anemophily—inflorescences were bagged in a fabric (tulle) with a 1.65 mm mesh, that permitted the passage of pollen grains but not that of insects; and (3) Natural pollination (control) — inflorescences were not manipulated, permitting pollination by biotic or abiotic vectors. Comparing (1) with (2) allows the inference of the involvement of wind, and (3) with (2) and (1), the participation of insects in pollination and overall reproductive success. Although the use of tulle fabric may inhibit air flow and can increase the humidity inside the bag, wind pollination is still detected. Since there is no other practical solution to exclude insects, this method has been adopted in other similar studies (Wragg & Johnson 2011; Huang *et al.* 2013).

RESULTS

Floral biology and dynamics of anthesis in Rhynchospora pubera

In the population studied, each *R. pubera* inflorescence comprised 3–6 spikelets, 7.3–8.2 mm long and congested into a capitulum. Each capitulum terminates a scape and is subtended by 7–8 green involucre bracts. Each spikelet comprised 5–9 hermaphroditic flowers (Fig. 1B). No osmophores were observed and the inflorescences have no perceptible odor. Pollen grains of *R. ciliata* and *R. pubera* were elliptical, with a polar diameter of $26.2 \pm 1.75 \mu\text{m}$ and $25.7 \pm 1.38 \mu\text{m}$, and equatorial diameter of $21.5 \pm 1.21 \mu\text{m}$ and $20.9 \pm 1.23 \mu\text{m}$, respectively. Pollen is the only floral resource of *R. pubera*.

The flowers of *R. pubera* displayed four distinct phenophases: (1) Bud phase, characterized by short filaments ($0.5 \pm 0.2 \text{ mm}$), undehiscent anthers, short style ($0.5 \pm 0.14 \text{ mm}$), short, nonreceptive stigmas ($2.0 \pm 0.15 \text{ mm}$), and a small ovary ($0.34 \pm 0.14 \text{ mm diam.}$);

(2) Functional flower phase, characterized by expanded filaments, styles and stigmas (4.30 ± 0.24 , 1.4 ± 0.28 and 2.6 ± 0.92 mm long respectively), dehiscent anthers, and receptive stigmas; (3) Nonfunctional flower phase, characterized by a lack of anthers (fallen), non-receptive stigmas, and an expanding ovary (0.87 ± 0.26 mm); (4) Fruiting phase, characterized by mature achenes (1.19 ± 0.33 mm diam.). These distinct four phenophases could be found in different flowers of different individuals of the same population at the same time, i.e., we can find different individuals with buds, functional flowers, nonfunctional flowers and fruits at the same time in the population. There was no flowering synchrony between individuals.

Each day, only a single flower opened per spikelet. Anthesis started about 6:30 h with the elongation of the filaments and the style. An hour later the anthers started dehiscing and the stigma became receptive (Fig. 2A, B). Around 12:00 h all pollen grains were released, the anthers and the stigma were dry, and the stigma was no longer receptive (Fig. 2C). An hour later, the anthers fell off (Fig. 2D). It should be noted that these observations took place in a single population during a single season.

Test of attractiveness to floral visitors

Rhynchospora ciliata and *R. pubera* shared the same species of visiting bees, *Augochloropsis* sp. (Halictidae, Augochlorini), *Frieseomelitta doederleini* (Friese 1900) (Apidae, Meliponini), *Plebeia droryana* (Friese 1900) (Apidae, Meliponini) and *Trigona spinipes* (Fabricius 1793) (Apidae, Meliponini). The visits of bees for both species started at 08:00 h and finished at 12:00 h. The bees exhibited the same behavior when visiting both species, heading directly to the anthers and collecting pollen (Fig. 1C), with the ventral surface of the abdomen contacting the stigma.

Rhynchospora ciliata and *R. pubera* had similar total numbers of visits by bees ($t = -0.66$, d.f. = 10, $p > 0.0695$; table 1). Nevertheless, the hours of peak visitation for each species were different, *R. ciliata* being visited more from 08:00 h to 10:00 h ($t = -3.77$; d.f. = 10; $p < 0.01$) and *R. pubera* from 10:00 h to 11:00 h ($t = 153.19$, d.f. = 10; $p < 0.01$) (Fig. 3).

The frequency of visits by different bee species differed in the two species. While the most frequent visitor to both *Rhynchospora* species was *Trigona spinipes*, the frequency of visits of the other pollinators differed in the two studied species (table 1).

The green involucre bracts of *Rhynchospora pubera* did not show UV light reflectance, but the white spikelet scales and anthers did (Fig. 1D).

Pollen availability

At the beginning of anthesis, at 07:30 h, when the anthers still had not dehisced, the flowers of *R. pubera* had an average of $20,892 \pm 5735$ pollen grains per flower. In this species, over the first two hours of insect visitation, the quantity diminished to 8825 ± 1253 grains per flower at 10:00 h, significantly more than in *R. ciliata* at the same time (3769.2 ± 865.8 ; $t = -10.66$, d.f. = 18, $p < 0.001$). It was also possible to verify that the anthers were dry and twisted at this time. By 12:00 h, little pollen remained in the anthers of *R. pubera* (702 ± 133), which were quite dried out (Fig. 2C). Both species have pollenkit on the pollen, clumps of 3-10 pollen grains were verified in both species, although it was also usual to find single pollen grains.

Pollination system

The exclusion experiments verified that *Rhynchospora pubera* is self-compatible and autogamous. Nevertheless, there were significant differences among the treatments ($\chi^2 = 20.89$, d.f. = 2, $p < 0.05$), with external pollination vectors being important to increasing the reproductive success of the species. Compared to self-pollination, wind pollination increased fruit set at least 21.6% and insect pollination increased it an additional 48.72%. Fruit formation was significantly different ($\chi^2 = 5.08$, d.f. = 1, $p < 0.05$; Table 2) between wind and insect pollination.

DISCUSSION

As expected, in *R. pubera* floral morphology, floral and inflorescence dimensions, the presence of four phenophases, the process of anthesis, anther dehiscence, and stigmatic receptivity are similar to those found for *R. ciliata* (Costa & Machado 2012). As for *R. ciliata*, pollen is the only resource for *R. pubera*, and both species don't emit floral scent perceptible by humans. Nevertheless, because *R. pubera* has green involucral bracts, we expected a lower number of insect visits to flowers in comparison to visits to the white-bracted *R. ciliata*. A comparison between the number of visits to the two species yielded no significant difference. Therefore, in this case at least, the white involucral bracts of *R. ciliata* were not a determinant in increasing the frequency of visits.

The times of peak visitation, however, were different for the two species. This difference suggests that bees are more attracted to *Rhynchospora ciliata*, which had a greater

number of visits during the first two hours after anthesis compared to *R. pubera*. When the pollen of *R. ciliata* becomes scarce, around 10:00 h (Costa & Machado 2012), the frequency of visits to *R. pubera* increases – it still has a high quantity of pollen per flower and, therefore, becomes a richer and more attractive source of pollen.

Furthermore, there was a difference in the total amount of pollen produced in the two species, with more pollen produced in *R. ciliata*. Pollen is a floral resource (Endress 1994, Lunau 2000, Agostini et al. 2014), and can also have a visual signaling function through the color and/or smell, attracting pollinators at short distances and increasing the number of visits (Dobson et al. 1999, Lunau 2000, Ushimaru et al. 2007). According to Lunau (2000) the effectiveness of pollen as an attractant signal depends on the amount made visible; an amount that may vary throughout the anthesis of a flower. In this way, the high amount of pollen in *R. ciliata* may attract bees and guarantees constancy of visits during the first two hours of anthesis. Likewise, the presence of high amounts of pollen in *R. pubera* after two hours of anthesis, when pollen is exhausted in *R. ciliata*, attracts the bees and guarantees constancy of visits to *R. pubera*.

Both species have traits which are potentially attractive to bees and, because of the presence of pollenkit, the pollen grains can adhere to floral visitors or to each other. This pollen aggregation may be aerodynamically disadvantageous when compared to anemophilous species that have less aggregated pollen or ambophilous species which usually have intermediate clumping of their pollen (Timerman et al. 2014). The large amount of pollen present in *R. pubera* after 10:00 h may be related to the lower number of visits in the first two hours of anthesis, as well as to the aggregation of the pollen grains, reducing their dispersal by wind during the anthesis. In *R. ciliata*, with similarly aggregated pollen grains, the visiting insects consume the pollen in the first two hours.

According to Cohen and Shmida (1993), flowers with a larger attractive area increase the visibility of the inflorescence to potential insect pollinators, as well as the number of visits. When choosing which plants to visit, insects usually adopt a foraging strategy that minimizes their travel, and they prefer species with higher visibility which, in general, correlates positively with higher reward. Furthermore, Vorobyev et al. (1999) verified that bees can detect UV-reflecting white objects on a green background and, according to Spaethe et al. (2001), this contrast with the green background makes them much more attractive than any other less conspicuous plant. The white involucral bracts of *Rhynchospora ciliata* are clearly distinct from the surrounding foliage and reflect UV light, in contrast to the green bracts of *R. pubera*. The spikelets of *R. pubera*, however, do reflect UV light, but are much

smaller and less conspicuous than the involucre bracts of *R. ciliata*. Therefore, we suggest that the white involucre bracts of *R. ciliata* should attract pollinators earlier and at a greater frequency, thus delaying visits by bees to *R. pubera* inflorescences.

Costa and Machado (2012) asserted that the involucre bracts of *Rhynchospora ciliata* can function as an attractant over long distances, and that the anthers, enclosing the pollen resource, also reflect UV light and may attract visitors. For *R. ciliata* to be visited, a reward must be present, therefore, the lack of a pollen reward after 10:00 h (Costa & Machado 2012), and the abundance of a pollen reward at this hour in *R. pubera*, as confirmed here, makes the latter species more attractive at this time for the bees. Although less attractive than the white involucre bracts of *R. ciliata*, the white spikelets scales and anthers of *R. pubera* also reflect UV light and can attract pollinating insects over a significant distance.

Sympatric species with similar floral structures and phenologies, such as these two *Rhynchospora* species, may compete for the services of the same pollinators (Levin & Anderson 1970). Pollinator preference for one of the species, such as *R. ciliata*, could gradually eliminate visits to the less preferred species, *R. pubera* as seen in the present case (Levin & Anderson 1970). Different peaks of visitation frequency, however, provides a temporal separation of visitation and could minimize interspecific competition for pollinators.

Rhynchospora ciliata and *R. pubera* share generalist pollinators which, according to Ghazoul (2006), permits their co-occurrence and does not inhibit their reproduction because of a limited availability of pollinators. An area with a larger number of flowers may be more attractive than areas with fewer flowers, increasing the availability of floral visitors (Johnson *et al.* 2012). If, however, the plant species have specialized pollination mechanisms, they would receive fewer floral visits and subsequently have lower fertilization. Because they are morphologically similar and provide the same kind of reward, we suggest that *R. ciliata* and *R. pubera* together can attract more generalist pollinators and potentially facilitate the pollination of both species, similar to found by Waser & Real (1979), Moeller (2004), and Ghazoul (2006) with other species and families.

Insect pollination of *R. pubera* could potentially be facilitated by the co-occurrence of *R. ciliata* since the latter, even when it no longer has pollen left (Costa & Machado 2012), could continue to attract pollinators from long distances because the white involucre bracts, and in this case, it may benefit *R. pubera*. Therefore, despite *R. ciliata* being more attractive, *R. pubera* can take advantage of the white involucre bracts of *R. ciliata* nearby, with insect visiting the exhausted pollen source of *R. ciliata*, thus increasing entomophily in *R. pubera*.

Similarly, *R. ciliata* could benefit from the presence of *R. pubera* because of the greater number of flowers in the area, providing more pollen reward, and the conspicuous spikelets and anthers reflecting UV light.

Rhynchospora pubera does not rely exclusively on pollen vectors for reproduction, as does *R. ciliata*, a condition considered essential to maintain ambophily (Culley *et al.* 2002). *Rhynchospora pubera* is self-compatible and autogamous, and has a high percentage of fruit set through both wind and insect pollination which, together, are important for the reproductive success of the species.

The white involucre bracts and the high amount of pollen may increase the attractiveness of *R. ciliata*, and are important features in maintaining ambophily in the species (Costa & Machado 2012). Although less conspicuous, the UV reflective white spikelet scales and white anthers of *R. pubera* also attract insect pollinators, and the pollination of this species could be facilitated by its proximity to *R. ciliata*. Moreover, the higher amount of pollen in *R. pubera* after two hours of anthesis, when the pollen in *R. ciliata* has been exhausted, may attract the bees and guarantees constancy of visits to *R. pubera*. In the area studied, the synchronopatry and sharing of insect pollinators by *R. ciliata* and *R. pubera* is an important strategy for maintaining their reproductive success, especially for *R. pubera*. However, further experiments with selective exclusion of each species in the field could better explain the influence of the presence of one species to the fruit set of the other. This study was carried out under natural conditions and we believe that future studies that perform experiments in controlled laboratory situations may be important to better understand the preference of the bees for inflorescences of *R. ciliata*. Within a phylogenetic context we are investigating the evolution of white involucre bracts and other traits that are putatively attractive to pollinators in *Rhynchospora*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for the doctoral fellowship for ACGC (IBPG-0452-2.05/10); the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the productivity fellowship for ICM; the National Science Foundation (DEB-0946618) for field assistance; Tasso Brito and Msc. Elivania Barral for assistance in the field; Arthur Domingos for the illustration of Figure 2; and Dr Diego Sotero for suggestions and comments the manuscript.

REFERENCES

- Ackerman J. D. (2000) Abiotic pollen and pollination: ecological, functional and evolutionary perspectives. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 167–185.
- Agostini K., Lopes A. V. & Machado I. C. (2014) Recursos florais. In: Rech A. R., Agostini K., Oliveira P. E. & Machado I. C. (Eds), *Biologia da polinização*. Projeto Cultural, Rio de Janeiro, RJ.
- Alves M., Hefler S. M., Trevisan R. & Silva-Filho P. J. S. Rhynchospora. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7278>. (accessed 21 July 2014).
- Alves M. V., Thomas W. W. & Wanderley M. G. L. (2002) New species of *Hypolytrum* Rich. (Cyperaceae) from the Neotropics. *Brittonia* **54**: 124–135.
- Araújo A. C., Longhi-Wagner H. M. & Thomas W. W. (2012) A Synopsis of *Rhynchospora* sect. *Pluriflorae* (Cyperaceae). *Brittonia* **64**: 381–393.
- Ayres M., Ayres Jr. M., Ayres D. L. & Santos A. S. (2007) *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDS/MCT/CNPq, Belém, BR.
- Brito V., Telles F. & Lunau K. (2014) Ecologia cognitiva da polinização. In: Rech A. R., Agostini K., Oliveira P. E. & Machado I. C. (Eds), *Biologia da polinização*. Projeto Cultural, Rio de Janeiro, RJ.
- Chittka L., Shmida A., Nikolaus T. & Menzel R. (1994) Ultraviolet as a component of flower reflections, and the colour perception of Hymenoptera. *Vision Research* **34**: 1489–1508.
- Cohen D. & Shmida A. (1993) The evolution of flower display and reward. *Evolutionary Biology* **27**: 197–243.
- Costa A. C. G. & Machado I. C. (2012) Flowering dynamics and pollination system of the sedge *Rhynchospora ciliata* (Vahl) Kük. (Cyperaceae): does ambophily enhance its reproductive success? *Plant Biology* **14**: 881–887.
- Culley T. M., Weller S. G. & Sakai A. K. (2002) The evolution of wind pollination in angiosperms. *Ecology & Evolution* **17**: 361–369.
- Dahlgren R. M. T., Clifford H. T. & Yeo P. F. (1985) *The families of the monocotyledons: structure, evolution and taxonomy*. Springer-Verlag, Berlin, DE.
- Dafni A., Pacini E. & Nepi M. (2005) Pollen and stigma biology. In: Dafni A., Kevan P. G. & Husband B.C. (Eds), *Practical pollination biology*. Editora Enviroquest L.T.D, Ontario, CA.

- Dobson H. E. M., Danielson E. M., Van Wesep I. D. (1999) Pollen odor chemicals as modulators of bumble bee foraging on *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae). *Plant Species Biology* **14**: 153–166
- Endress P. K. (1994) *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Friedman J. (2011) Gone with the wind: understanding evolutionary transitions between wind and animal pollination in the angiosperms. *New Phytologist* **191**: 911–913.
- Friedman J. & Barrett S. C. H. (2009) The consequences of monoecy and protogyny for mating in wind-pollinated *Carex*. *New Phytologist* **181**: 489–497.
- Ghazoul J. (2006) Floral diversity and the facilitation of pollination. *Journal of Ecology* **94**: 295–304.
- Johnson S. D., Hollens H. & Kuhlmann M. (2012) Competition versus facilitation: conspecific effects on pollinator visitation and seed set in the iris *Lapeirousia oreogena*. *Oikos* **121**: 545–550.
- Huang S., Xiong Y. & Barrett S. C. H. (2013) Experimental Evidence of insect pollination, Juncacea, a primarily wind-pollinated family. *International Journal of Plant Sciences* **174**: 1219–1228.
- Leppik E. E. (1955) *Dichromena ciliata*, a noteworthy entomophilous plant among Cyperaceae. *American Journal of Botany* **42**: 455–458.
- Levin D. A. & Anderson A. W. W. (1970) Competition for pollinators between simultaneously flowering species. *The American Naturalist* **104**: 455–467.
- Linder H. P. (1998) Morphology and the evolution of wind pollination. In: Owens S.J. & Rudall P. J. (Eds) *Reproductive Biology in Systematics, Conservation and Economic Botany*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Lunau T. D. K. (2000) The ecology and evolution of visual pollen signals. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 89–111.
- Maêda J. M. (1985) *Manual para uso da câmara de Newbauer para contagem de pólen de espécies florestais*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, BR.
- Magalhães A. F., Ruiz A. L. T. G., Flach A., Faria A. D, Magalhães E. G. & Amaral M. C. E. (2005) Floral scent of *Eleocharis elegans* (Kunth) Roem. & Schult. (Cyperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **33**: 675–679.
- Moeller D. A. (2004) Facilitative interactions among plants via shared pollinators. *Ecology* **85**: 3289–3301.

- Spaethe J., Tautz J. & Chittka L. (2001) Visual constraints in foraging bumblebees: flower size and color affect search time and flight behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 3898–3903.
- Thomas W. W. (1984a) The systematics of *Rhynchospora* section *Dichromena*. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **37**: 1–116.
- Thomas W. W. (1984b). Insect pollination of *Cymophyllus fraseri* (Cyperaceae). *Castanea* **49**: 94–95.
- Timerman D., Greene D. F., Ackerman J. D., Kevan P. G. & Nardone E. (2014). Pollen aggregation in relation to pollination vector. *International Journal of Plant Sciences* **175**: 681–687.
- Ushimaru A., Watanabe T., Nakata K. (2007) Colored floral organs influence pollinator behavior and pollen transfer in *Commelina communis* (Commelinaceae). *American Journal of Botany* **94**: 249–258.
- Vogel S. (1990). *The Role of scent glands in pollination*. Smithsonian Institution Libraries, Washington, US.
- Vorobyev M., Ibarra N. H., Brandt R. & Giurfa M. (1999). Do “white” and “green” look the same to a bee? *Naturwissenschaften* **86**: 592–594
- Waser N. M. & Real L. A. (1979) Effective mutualism between sequentially flowering plant species. *Nature* **281**: 670 – 672.
- Wragg P. D. & Johnson S. D. (2011) Transition from wind pollination to insect pollination in sedges: experimental evidence and functional traits. *New Phytologist* **191**: 1128–1140.

TABLES

Table 1 Results of test of attractiveness to floral visitors of *Rhynchospora ciliata* and *R. pubera* in the Parque Estadual Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil.

Insect visits	<i>R. ciliata</i>	<i>R. pubera</i>
Total number of visits	51.4 ±15.7	58.5 ±11.6
Frequency of <i>Trigona spinipes</i>	50.6%	76,1%
Frequency of <i>Augochloropsis</i> sp.	31.9%	0.8%
Frequency of <i>Frieseomelitta doederleini</i>	9.7%	3.4%
Frequency of <i>Plebeia droryana</i>	7.8%	19.7%

Table 2 Results of experiments to determine pollination vectors operating in *Rhynchospora pubera* along the forest edge in the Parque Estadual Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil. Different letters indicate significant differences between experiments.

Treatment	Flowers (n)	Fruits (n)	Reproductive success (%)
Spontaneous self pollination	56	13	23.2 ^a
Insect exclusion	29	13	44.8 ^b
Control (natural)	31	29	93.5 ^c

Figure Legends

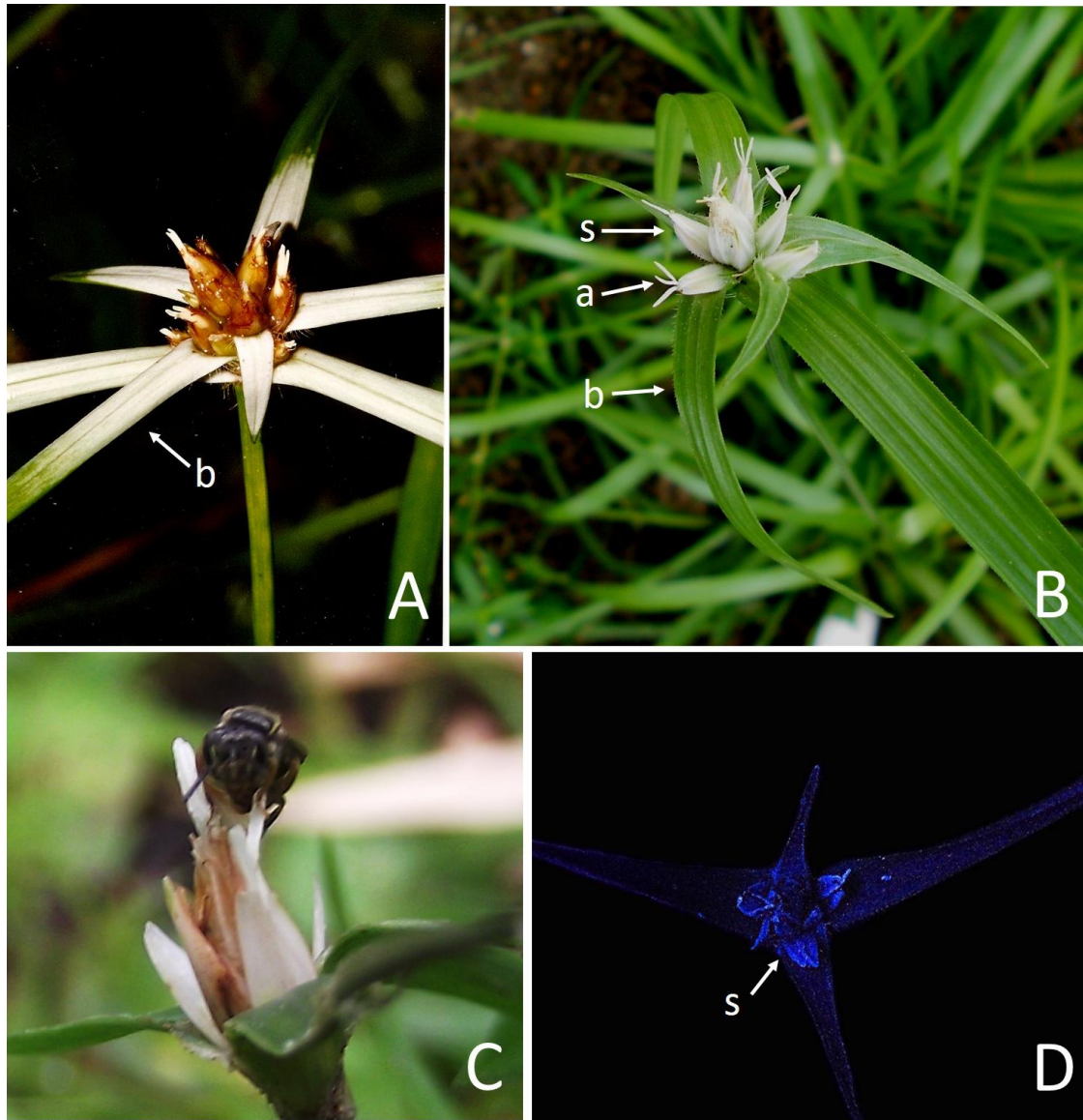


Fig. 1 Inflorescences of *Rhynchospora ciliata* (A) and *R. pubera* (B), showing the white involucre bracts in *R. ciliata* and the green involucre bracts in *R. pubera*. C. *Plebeia droryana* (Apidae, Meliponini) visiting flowers of *R. pubera*. D. Ultra violet light reflection as shown by white spikelet scales and anthers of *R. pubera*. Arrows: a, anthers; b, bracts; s, white spikelet scales.

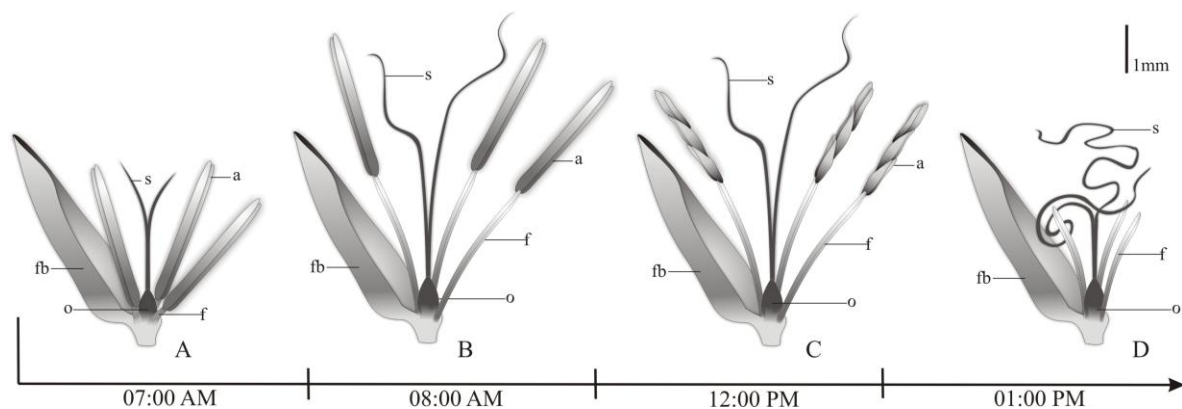


Fig. 2 The timing of floral anthesis in *Rhynchospora pubera*. A. Showing elongation of the filaments, style and stigma. (A and B) at the beginning of anthesis, the dry twisting anthers which fall off, and the dried stigma at the end of anthesis (C and D). Arrows: a, anthers; f, filament; fb, floral bracts; o, ovary; s, stigma.

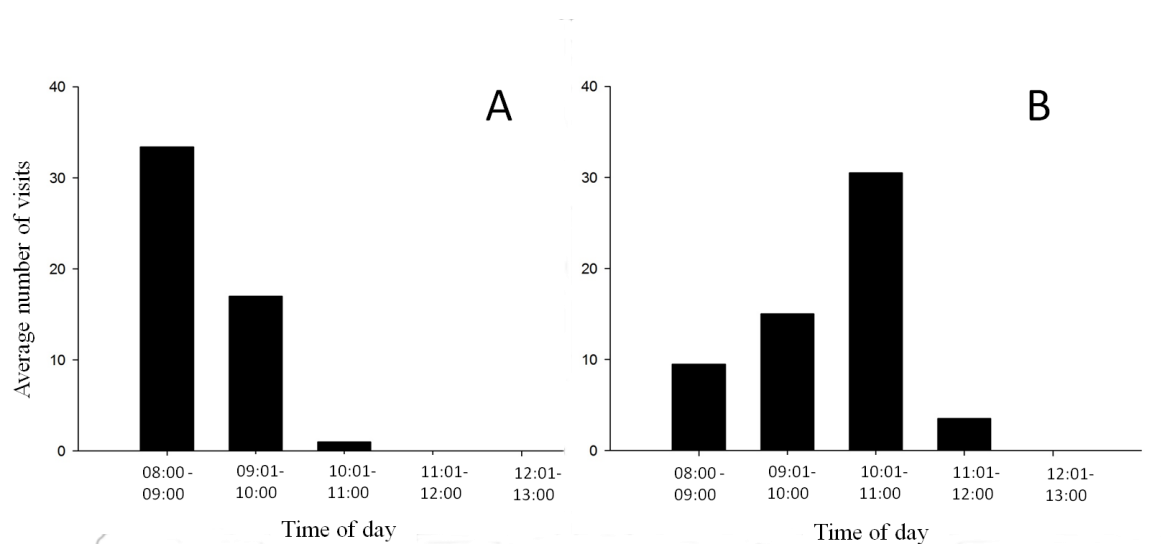


Fig. 3 Average number of insect visits in 36 hours during six days to *Rhynchospora* populations in Parque Estadual Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil. A. *Rhynchospora ciliata*. B. *Rhynchospora pubera*.

**5 INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL VARIATION ON THE POLLINATION
OF THE AMBOPHILOUS SEDGE RHYNCHOSPORA CILIATA
(CYPERACEAE)**

Ana Carolina Galindo da Costa¹, Isadora Schulze de Albuquerque², William Wayt Thomas³, Isabel Cristina Machado^{1, 4}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Recife, Pernambuco, Brazil

²Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Recife, Pernambuco, Brazil

³The New York Botanical Garden, Bronx, New York, U.S.A.

⁴Author for correspondence: email: imachado@ufpe.br, phone: +55 (81) 21268945

Manuscrito aceito no periódico Plant Ecology

ABSTRACT

In typically anemophilous families, there are species, such as *Rhynchospora ciliata* (Cyperaceae), in which both wind and insects have been registered as pollen vectors (ambophily). However, the contribution of each vector to pollination of ambophilous species can change under different environmental conditions. Therefore, this study aimed to determine the primary pollination system, abiotic or biotic, of *R. ciliata*, comparing wet and dry seasons. We tested the following hypotheses: (1) in dry months wind is the main pollen vector of *R. ciliata*; (2) in wet months insects will contribute more to reproductive success of *R. ciliata* and compensate for low fruit formation by the abiotic vector. Our hypothesis was partially confirmed. We found that higher wind speed can favor the pollination by wind in *R. ciliata* even in wetter months. Because insects were less susceptible to environmental variation, they contributed more in dry months with low wind speed, compensating for lower fruit set by wind. High rainfall and humidity can result in faster settling of pollen grains suspended in the air, however, rainfall does not prevent pollination by wind. Since individuals of *R. ciliata* are located near the edge of the forest, grouped quite close together, and as the inflorescence is located at the apex of the floral scape, the wind can act as pollen vector and rainfall effects can be minimized. The contribution of each pollen vector is important to the reproductive success of *R. ciliata* and the effectiveness of the wind varies with local environmental conditions.

Keywords: ambophily; anemophily; Atlantic Forest; entomophily; environmental variations; phenology

INTRODUCTION

Anemophily (wind pollination) is a plesiomorphic condition in Cyperaceae (Leppik 1955; Ackerman 2000). In general, representatives of this family have anemophilous traits that allow greater efficiency of wind as a pollen vector and have characteristics less attractive to potential pollinators, such as small greenish flowers, lack of floral odor, lack of nectaries, and a reduced or absent perianth (Leppik 1955; Faegri and Pijl 1979; Endress 1994; Ackerman 2000; Willmer 2011; Rech et al. 2014). However, studies have shown that some species of Cyperaceae have conspicuous traits that can attract insect pollinators, such as white or yellow involucral bracts and white or blue anthers (Leppik 1955; Thomas 1984; Dahlgren et al. 1985; Ramos and Fonseca 2006; Wragg and Johnson 2011; Costa and Machado 2012; Costa et al. 2017).

The shift from anemophily to entomophily does occur (Linder 1998) and phylogenetic analyses suggest some reversals, as in the case of *Rhynchospora ciliata* (Vahl) Kükenthal, a species of Cyperaceae, a family in which the first diverging species are anemophilous (Thomas et al. 2009). *Rhynchospora ciliata* was first studied by Leppik (1955), and more recently by Costa and Machado (2012) and Costa et al. (2017) who documented the role of the white involucral bracts and anthers in insect attraction, and ambophily as the pollination system.

It is unclear whether ambophily is an intermediate stage in the transition from anemophily (pollination by wind) to total entomophily (pollination by insects) or an evolutionarily stable strategy selected for its flexibility (Friedman and Barrett 2009). Ambophily is considered stable when the combination of vectors (wind and insects) results in higher fruit set than in either system alone (Culley et al. 2002), as seen in *R. ciliata* by Costa and Machado (2012). Both wind and biotic vectors are important to the

pollination of *R. ciliata*, giving the advantage of a mixed pollination system, which can maximize pollination under different environmental conditions as proposed by Costa and Machado (2012). More studies on ambophily are needed in order to establish its frequency and evolutionary relationships with animal and wind pollination (Friedman and Barrett 2009).

Rhynchospora ciliata inhabits the tropical semi-deciduous forests of the Atlantic Forest biome, with high humidity and average annual rainfall of ca. 2000 mm (Coutinho et al. 1998), conditions which reduce pollen transport distances and favor fast seating of pollen grains that are suspended in the air (Whitehead 1969; Endress 1994; Rech et al. 2016). Furthermore, although the species occurs along forest edges, the dense vegetation structure of rainforest lowers wind velocities (Whitehead 1969, 1983).

Molina et al. (2001) studied wind pollinated *Plantago* species and verified that pollen concentration in the air is negatively correlated with rainfall and relative humidity and positively correlated with temperature. These authors observed that high average wind speed is negatively correlated with pollen concentration, and during periods of calm, pollen concentration in the air was higher. High wind speeds, however, are important for more effective pollen dispersal in anemophilous plants (Friedman and Barrett 2009). In a recent study, using a global dataset, Rech et al. (2016) verified that the proportion of plants pollinated by biotic vectors is positively associated with temperature and plant species richness, and animal pollination was positively related to higher precipitation in forests. Therefore, the contribution of each pollen vector, wind or insects, to reproductive success of ambophilous species may vary according to environmental variables.

Data on the relative role of wind or insects in the pollination of ambophilous species have been estimated for short periods, but without considering environmental seasonality (Culley et al. 2002; Costa and Machado 2012; Wragg and Johnson 2011). Our study,

therefore, aimed to discover which is the primary pollination system, abiotic or biotic, of *Rhynchospora ciliata* in both wet and dry seasons. To do so, we tested the following hypotheses: (1) in dry months wind is the main pollen vector of *R. ciliata*; (2) in wet months insects will contribute more to reproductive success of *R. ciliata* and compensate for low fruit formation by the abiotic vector.

METHODS

Species studied and study site

Rhynchospora ciliata is an herbaceous species that occurs in open areas and forest edges. This species is native to Brazil (Alves et al. 2015) and its distribution ranges from southern Mexico and the West Indies to Bolivia and Brazil (Thomas 1984). The inflorescence of *R. ciliata* is a cluster of small spikelets (a capitulum) at the apex of each floral scape, with each spikelet having 18.6 ± 2.6 hermaphroditic flowers and a few morphologically staminate flowers which are functionally neutral due to lack of pollen grains in their anthers. The bisexual flowers are each subtended by one bract, and have three stamens and a single style that bifurcates into two stigmas. The flowers show four different floral phenophases: bud, functional flower (with filaments and style elongated), non-functional flower, and fruit (Fig 1A). Flowering is continuous throughout the year and only one flower of each spikelet opened each day (Costa and Machado 2012).

The fieldwork was carried out in two fragments of Atlantic coastal forest within the city of Recife, Pernambuco, NE Brazil. Both are tropical semi-deciduous forest and experienced a distinct dry season (Thomas and Barbosa 2008). Historical weather data for Recife shows that, in general, September to January is the dry season, with less than 100 mm of rainfall per month. The other months are wetter, ranging 150 to 400 mm of rainfall

per month (INMET 2016). During our study, however, we used the actual rainfall of each month in order to classify it as dry or wet. Months with less than 100 mm of rainfall were considered dry, and those with more were considered wet. At the study site, the dry months are also characterized by humidity around 70%, average maximum temperatures of 28°C, and average wind speed of ca. 4m/s. In the rainy months, the humidity is ca. 80%, the average temperature is ca. 31°C, and the average wind speed is 6 m/s.

From August 2007 through July 2008 the study sites were three natural populations of *R. ciliata*, located at the edge of a 367 ha forest, the Parque Estadual Dois Irmãos (8°7' S, 34°52' W). For six months, from September through December 2014 and January and April 2015, we also studied one natural population of *R. ciliata* at the forest edge in a 10.7 ha forest fragment, the Jardim Botânico do Recife, (08°04' S, 34°59' W). A voucher specimen from each site was deposited in the Herbarium UFP – Geraldo Mariz (UFP nos. 53,313 and 77,762).

Phenology

For the analysis of reproductive phenology, we checked the duration of individual flowers and the inflorescence. Ten inflorescences in each of the three populations of *Rhynchospora ciliata* at the Parque Estadual de Dois Irmãos were selected, and used to track phenophases of bud formation, flowering, and fruit development; the number of spikelets on each marked scape was also counted. Every time the flowers of an inflorescence opened, fruited, dispersed their fruits, and entered senescence, we marked new inflorescences, totaling, in six replicates of three populations each, 180 inflorescences monitored over twelve months, from August 2007 to July 2008.

To check for a possible difference between the number of flowering scapes in the population in wet and dry months, we analyzed the reproductive phenology of

Rhynchospora ciliata. For six months, at the Jardim Botânico do Recife, we recorded the peak of floral scape production, using an index adapted from Fournier (1974), in which scores of 0 to 4 were used to record the density of flowering scapes as a percentage of the plants in the clump: 0 = no scapes; 1 = scape density between 1% and 25%; 2 = scape density between 26% and 50%; 3 = scape density between 51% and 75%; and 4 = scape density between 76% and 100%. A *t*-test was used to verify differences between density of flowering scapes in wet and dry months.

Environmental data

Rainfall, relative humidity, temperature, maximum wind speed and average wind speed at the studies sites were obtained from the National Institute of Meteorology-INMET (table 1). Before the analyses, we verified possible correlation between the environmental data. We confirmed the positive correlation between rainfall and humidity ($r = 0.96$; $p < 0.05$), the negative correlation between rainfall and temperature ($r = -0.88$; $p < 0.05$), the negative correlation between humidity and temperature ($r = -0.92$; $p < 0.05$), and the lack of correlation between rainfall, humidity and temperature with maximum and average wind speed ($r < 0.7$; $p > 0.05$). Therefore, for the following analyses we just considered uncorrelated environmental variables, such as rainfall, maximum wind speed and average wind speed. All the data were tested for homoscedasticity and normality. The non-normal data were transformed using the square root. Statistical tests were carried out using the package Statistica 13.1, and for all analyses we considered $\alpha = 0.05$.

Reproductive system

To test the two hypotheses, we carried out controlled pollination experiments to verify the contribution of both the biotic and abiotic pollen vectors to the reproductive

success of *Rhynchospora ciliata*. We carried out the experiment six times, once in each of six months, September through December 2014, and January and April 2015. In each month we used ten inflorescences from different scapes with pre-anthesis flower buds in each of the following experiments: (1) testing for anemophily, in which the ten inflorescences were isolated in thin fabric bags (tulle) with a 1.65 mm mesh, preventing contact with insects but allowing free passage of pollen carried by the wind; and (2) testing for spontaneous self-pollination, in which ten inflorescences were covered with semi-permeable paper bags, preventing both the passage of pollen carried by the wind and the access of insects to flowers. At the same time, we measured natural pollination through both biotic and abiotic pollen vectors, from ten marked and uncovered inflorescences (control). This experiment allowed us to compare the treatments, revealing the formation of fruits only by wind as pollen vector. Comparing the control with the two treatments, we had a measure of fruit set only by insects. A chi-square (χ^2) analysis was used to test for differences between treatments in each month (pairwise). In addition, a multiple linear regression was used to verify whether the environmental variables favor fruit set by one of the pollen vectors - also applying a principal component analysis (PCA) to confirm our results. Environmental variables, such as rainfall, maximum wind speed, and average wind speed were considered independent variables, and the contribution of wind and insects to fruit set were considered dependent variables.

Floral visitors

During the same period, from September through December 2014, and January and April 2015, we carried out field observations to record average number of flower visitors on the study plants in a 1 m² area, from 0830 to 1200 h, during anthesis. The counting was done on a single day for each month and was replicated in a separate 1 m² area on the

same day, giving a total of 8 h of observation per month, and 48 h in total. Insects that came in contact with reproductive structures and were able to transfer pollen grains from one individual to the stigma of another individual were considered effective pollinators. Those that collected pollen but were not able to transfer pollen from one individual to the stigma of another individual were considered pollen robbers.

Flower visitors were captured using large-mouthed containers and then, they were dry mounted and deposited as voucher specimens in the entomological collection of the Laboratory of Floral and Reproductive Biology of the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. We carried out linear regressions to determine whether the quantity of visits was correlated with amount of fruit set by insects, and with environmental variables. For this analysis we just considered the effective pollinators.

Multiple linear regressions were used to understand if there is a significant relationship between the contribution of insects to fruit set (dependent variable) in *Rhynchospora ciliata* and the number of visits of insects (independent variable) in this species. This analysis was also performed to check if there is a significant relationship between number of visits of effective pollinators (dependent variable) and environmental variables, such as rainfall, maximum wind speed and average wind speed (independent variables).

RESULTS

Phenology

We verified that scapes exhibited young spikelets from the moment they emerge from the rhizome, and their development pattern lasted about two months. The number of spikelets increases with time (from 3 - 5 in the beginning of the formation of the spikelets to 15 – 17 at maturity) as well as the number of flowers on each scape. Few (10 to 15)

flowers opened on an inflorescence per day. After one and a half months, however, all flowers had matured and dispersed their fruits, with the scapes entering into senescence. There was no difference between the number of scapes with functional flowers in the wet and dry periods ($t=0.6209$; $df=4$; $p=0.56$).

Reproductive system

In the pollen vector exclusion experiments, we verified that the participation of both wind and insects in fruit set varied over time (Table 1). September (wind + self-pollination vs. self-pollination: $\chi^2=95.5$, $df=1$, $p=0.05$) and October ($\chi^2=119.96$, $df=1$, $p<0.05$) were the months when wind contributed more to fruit set. Excluding the percentage of fruits set by self-pollination, wind increased fruit set by more than 50% in these months. There was a significant difference between the treatments of wind pollination and spontaneous self-pollination in December ($\chi^2=9.05$, $df=1$, $p<0.05$) and April ($\chi^2=4.63$, $df=1$, $p<0.05$), but in these months, wind contributed less than 20% to fruit set. Environmental variables, such as high rainfall, maximum wind speed, and maximum average wind speed were positively related to higher fruit set by wind ($R^2=0.98$, $p=0.01$) (Fig. 2). However, multiple regression analysis indicates that rainfall and maximum wind speed are the environmental variables that effectively predict the fruit set by wind (Table 2).

Fruit set by insects was significantly different from that by wind pollination and self-pollination in the months of November (self-pollination + wind vs. self-pollination + wind + insect: $\chi^2=9.64$, $df=1$, $p<0.05$), December ($\chi^2=5.54$, $df=1$, $p<0.05$), January, when it was higher ($\chi^2=15.43$, $df=1$, $p<0.05$), and April ($\chi^2=30.61$, $df=1$, $p<0.05$) (Table 1). Variation in insect pollination in *Rhynchospora ciliata* was independent of the environmental variables ($R^2=0.87$; $p=0.07$) (Fig. 3).

There was no significant correlation between the number of visits by pollinators and the fruit set by insects ($R^2=-0.22$; $p=0.76$) (Fig. 4A). As stated above, there was also no significant correlation between the number of visits of pollinators and environmental variables, such as rainfall, maximum wind speed, and average wind speed ($R^2=0.55$; $p=0.25$) (Fig. 4B). Pollination by insects was more or less constant and contributed more in months in which wind pollination was less efficient. Therefore, the biotic pollen vector was not sensitive to environmental variations. Thus, the PCA analysis allowed us to verify that rainfall and maximum wind speed explain more than 95% of the variation in fruit set by wind (Fig. 5).

Floral visitors

We recorded six bee species, *Apis mellifera* L., *Trigona spinipes* Fabricius, *Plebeia* sp. Friese, *Frieseomelitta doederleini* Friese, and three Halictidae species on flowers of *Rhynchospora ciliata*, all of them collecting pollen. In addition to the bees, we recorded three species of flies, two species of beetles, and one wasp visiting flowers of *R. ciliata*. When approaching, bees and flies go straight to the anthers of the flowers and contacted anthers and stigmas with the ventral part of their abdomen – they were considered effective pollinators. Beetles and wasps were considered occasional pollinators or pollen robbers (Fig. 1B-D). The visits of pollinators and pollen robbers were more frequent between 0800 and 1000 h, and no visit was recorded after 1200 h.

DISCUSSION

The flowering pattern of *Rhynchospora ciliata* is continuous (*sensu* Newstrom et al. 1994) at the population level, with production of a few flowers per day, per inflorescence

over a long period of time, associated with the ‘steady state’ strategy (Gentry 1974). Therefore, the lack of significant variation in the number of inflorescences may play an important role to the visual memory that bees have of flowers, providing their feeding needs and assuring constancy of visits and cross-pollination by these pollen vectors. In *R. ciliata*, bees can increase fruit set up 39% (Costa and Machado 2012).

According to the results presented here, our hypothesis was partially confirmed. The insects contributed more to fruit set of *R. ciliata* in the months in which wind was less efficient. However, we expected that in wetter months, wind pollination in *R. ciliata* would be less efficient, but this pollen vector contributed more to fruit set of *R. ciliata* in these months, when the maximum wind speed was also higher. According to Whitehead (1983) low rainfall and humidity are the most suitable environmental conditions for wind pollination. Periods of high rainfall and humidity result in faster settling of pollen grains suspended in the air (Whitehead 1969; Whitehead 1983; Molina et al. 2001) but Whitehead (1983) believes that this does not prevent the pollination by wind, an idea that was corroborated in this study.

Although wind pollination is generally considered a less precise process compared to biotic pollination, it succeeds in places where the pollen transport by the wind is not obstructed by dense vegetation and where many individuals of the same species grow close to each other (Leppik 1955; Faegri and Pijl 1979; Regal 1982; Endress 1994; Bowker and Crenshaw 2007). In this sense, individuals of *Rhynchospora ciliata* are often found along the edge of the forest and grouped close together, allowing wind to be effective in pollination and minimizing the inhibiting effects of high rainfall and humidity (Whitehead 1983). As Bawa and Crisp (1980) demonstrated in the case of *Trophis involucrata* W.C. Burger (Moraceae), individuals which are very close to each other can be wind pollinated even in a high rainfall environment. Furthermore, the inflorescence

position at the top of the floral scape, as in *R. ciliata*, might minimize the negative environmental effects (Whitehead 1983). Although pollinators were fairly constant and less sensitive to environmental variations, abiotic pollination can offer an escape from dependency on pollinators, if there is a limitation of pollinators in space or time (Cox and Grubb 1991; Goodwillie 1999), and represent an alternative to self-pollination (Goodwillie 1999).

The lack of a significant difference between the number of visits of bees and flies in the dry and rainy periods supports the conclusion that insects are more directional and less susceptible to environmental variation than is wind pollination (Faegri and Pijl 1979; Endress 1994; Costa and Machado 2012). However, some studies have shown that rain and high humidity have a strong negative impact on insects such as bees foraging for pollen. These insects prefer drier environments and higher temperatures (Wratt 1968; Peat and Goulson 2005; Puškadija et al. 2007). According to Peat and Goulson (2005), bees that collect pollen avoid dew or rain water droplets, which would make grooming pollen into the corbiculae difficult.

Although insects contributed more to fruit set of *Rhynchospora ciliata* in months with lower precipitation, lower humidity, and higher average temperatures, in the wetter months fruit set by anemophily was so high that insects could not contribute significantly to the reproductive success of *R. ciliata*. In the drier months, when wind is a less effective vector, insects are essential to maintaining high levels of sexual reproduction of this species. According to Culley et al. (2002), the establishment of an ambophilous system can be maintained when the combination of vectors (wind and insects) results in higher fruit formation than in either system independently. This situation with *R. ciliata* may occur in dry months where insects compensates for the pollination services of the wind. Therefore, we suggest that the contribution of each pollen vector is important to the

reproductive success of an ambophilous species, and it depends on the local environmental conditions such as precipitation and maximum wind speed. This reinforces the idea that ambophily can be a stable pollination system.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for the doctoral fellowship (IBPG-0452-2.05/10) for ACGC, and an undergraduate scholarship – PIBIC/CNPq/FACEPE) for ISA; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for partial financial support (Edital Universal 459485/2014-8) and for a productivity fellowship for ICM; and the National Science Foundation (DEB-0946618) to WWT for field assistance.

REFERENCES

- Ackerman JD (2000) Abiotic pollen and pollination: Ecological, functional, and evolutionary perspectives. *Plant Syst Evol* 222: 167-185
- Alves M, Hefler SM, Trevisan R, Silva Filho PJS (2015) *Rhynchospora*. In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7265> Accessed 11 September 2015
- Bawa KS, Crisp JE (1980) Wind-Pollination in the Understorey of a Rain Forest in Costa Rica. *J Ecol* 68: 871-876
- Bowker JE, Crenshaw HC (2007) Electrostatic forces in wind-pollination, Part 2: Simulations of pollen capture. *Atmos Environ* 41: 1596-1603

- Costa ACG, Machado IC (2012) Flowering dynamics and pollination system of the sedge *Rhynchospora ciliata* (Vahl) Kük. (Cyperaceae): does ambophily enhance its reproductive success? *Plant Biol* 14: 881-887
- Costa ACG, Thomas WW, Machado IC (2017) Comparative floral biology of *Rhynchospora ciliata* (Vahl) Kükenth and *R. pubera* (Vahl) Boeckeler (Cyperaceae): the role of white involucral bracts in attracting pollinating insects. *Plant Species Biol.* doi:10.1111/1442-1984.12173
- Coutinho RQ, Lima Filho MF, Souza Neto JB, Silva EP (1998) Características climáticas, geológicas, geomorfológicas e geotécnicas da Reserva Ecológica Dois Irmãos. In: Machado IC, Lopes AV, Pôrto KC (Eds) Reserva Ecológica Dois Irmãos: estudos em um remanescente de Mata Atlântica em área urbana. ECTMA, Editora Universitária – UFPE, Recife, pp 21–49
- Cox PA, Grubb PJ (1991) Abiotic pollination: An evolutionary escape for animal-pollinated Angiosperms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 333: 217-224
- Culley TM, Weller SG, Sakai AK (2002) The evolution of wind pollination in angiosperms. *Ecol Evol* 17: 361-369
- Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PF (1985) The families of the monocotyledons: structure, evolution and taxonomy. Springer-Verlag, Berlin
- Endress PK (1994). Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. University Press, Cambridge, UK
- Faegri K, van der Pijl L (1979) The principles of pollination ecology. 3rd ed, Pergamon Press, Oxford
- Friedman J, Barrett SCH (2009) The consequences of monoecy and protogyny for mating in wind-pollinated *Carex*. *New Phytol* 181: 489-497

- Fournier L (1974) Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas em árboles. Turrialba 24: 422-423
- Gentry AH (1974) Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae Biotropica 6: 64-68
- Goodwillie C (1999) Wind pollination and reproductive assurance in *Linanthus parviflorus* (Polemoniaceae), a self-incompatible annual. Am J Bot 86: 948–954
- Leppik EE (1955) *Dichromena ciliata*, a noteworthy entomophilous plant among Cyperaceae. Am J Bot 42: 455- 458
- Linder HP (1998) Morphology and the evolution of wind pollination. In: Owens SJ, Rudall PJ (Eds) Reproductive biology in systematics, conservation and economic botany. Royal Botanic Gardens, Kew
- Luceño M, Alves MV, Mendes, AP (1997) Catálogo florístico y claves de identificación de las ciperáceas de los estados de Paraíba y Pernambuco (Nordeste do Brasil). An Jard Bot Madr 55: 67–100
- Molina RT, Palacios IS, Rodríguez AFM, Muñoz JT, Corcheros AM (2001) Environmental factors affecting airborne pollen concentration in anemophilous species of *Plantago*. Ann Bot 87: 1-8
- Newstrom LE, Frankie GW, Baker HG (1994) A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. Biotropica 26: 141-159
- Peat J, Goulson D (2005) Effects of experience and weather on foraging rate and pollen versus nectar collection in the bumblebee, *Bombus terrestris*. Behav Ecol Sociobiol 58: 152-156

- Puškadija Z, Štefanić E, Mijić A, Zdunić Z, Parađiković N, Florijančić T, Opačak A (2007) Influence of weather conditions on honey bee visits (*Apis mellifera carnica*) during sunflower (*Helianthus annuus* L.) blooming period. *Agriculture* 13: 230-233
- Ramos COC, Fonseca RBS (2006) Polinização de *Rhynchospora almensis* D. A. Simpson (Cyperaceae), no município de Palmeiras, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. In: Viana BF, Oliveira FF (Eds) *Biologia e ecologia da polinização: curso de campo*. EDUFBA, Salvador, pp: 25-30
- Rech AR, Bergamo PJ, Figueiredo RA (2014) Polinização abiótica. In: Rech AR, Agostini K, Oliveira PE, Machado IC (Eds) *Biologia da Polinização*. Projeto Cultural, Rio de Janeiro
- Rech AR, Dalsgaard B, Sandel B, Sonne J, Svenning JC, Holmes N, Ollerton J (2016) The macroecology of animal versus wind pollination: ecological factors are more important than historical climate stability. *Plant Ecol Divers* 9: 253-262
- Regal PJ (1982) Pollination by wind and animals: Ecology of geographic patterns. *Annu Rev Ecol Syst* 13: 497-524
- Thomas WW (1984) The systematics of *Rhynchospora* section *Dichromena*. *Mem N Y Bot Gard* 37:1-116
- Thomas WW, Barbosa MRV (2008) Natural Vegetation Types in the Brazilian Atlantic Coastal Forest North of the Rio Doce. In: Thomas WW (Ed) *The Atlantic Coastal Forest of Northeastern Brazil*. *Mem N Y Bot Gard* 100: 6-20
- Thomas WW, Araujo AC, Alves MV (2009) A preliminary molecular phylogeny of the Rhynchosporaeae (Cyperaceae). *Bot Rev* 75: 22–29
- Thompson JD (2001) How do visitation patterns vary among pollinators in relation to floral display and floral design in a generalist pollination system? *Oecologia* 126:386–394

- Whitehead DR (1969) Wind pollination in the Angiosperms: Evolutionary and environmental considerations. *Evolution* 23: 28-35
- Whitehead DR (1983) Wind pollination: some ecological and evolutionary perspectives. In: Real L (Ed) *Pollination biology*. Academic Press, Orlando, pp. 97-108
- Willmer P (2011) *Pollination and floral ecology*. Princeton University Press, New Jersey.
- Wragg PD, Johnson SD (2011) Transition from wind pollination to insect pollination in sedges: experimental evidence and functional traits. *New Phytol* 191: 1128-1140
- Wratt EC (1968) The pollinating activities of bumble bees and honeybees in relation to temperature, competing forage plants, and competition from other foragers. *J Apic Res* 7: 61-66

TABLES

Table 1 Contribution of wind and insects to reproductive success of *Rhynchospora ciliata*, and environment variables, September to December 2014 and January and April 2015. SSP: Spontaneous Self-Pollination; WP: Wind Pollination; IP: Insect Pollination; R: Rainfall; H: Humidity; T: Temperature; MWS: Maximum Wind Speed; AWS: Average Wind Speed.

Months	SSP (%)	WP (%)	IP (%)	R (mm)	H (%)	T (°C)	MWS (m/s)	AWS (m/s)
Sep	7.3	64.43	3.73	248.9	80.28	28.47	5	1.89
Oct	3.71	51.69	8.41	146.5	78	29.13	6.7	2.10
Nov	16.39	10.54	18.55	56	70.87	30.5	3.8	1.80
Dec	12.4	17.8	18.42	71.3	71.5	30.75	4.2	1.86
Jan	4.34	8.16	30.87	65.4	71.29	31.64	4.3	2.24
Apr	13.79	14.02	19.3	74.6	71.61	31.63	3.5	1.58

Table 2 Results of multiple regression to investigate the influence of environmental variables (R: Rainfall; MWS: Maximum Wind Speed; and AWS: Average Wind Speed) (independent variables) on fruit set by Wind and Insects.

Variable	Wind				Insects			
	Coefficient	S.E	t	p-value	Coefficient	S.E	t	p-value
R	0.46	0.06	8.18	0.01	-0.28	0.09	-3.26	0.08
MWS	4.11	0.88	4.68	0.04	-2.07	1.35	-1.53	0.26
AWS	-6.53	2.12	-3.08	0.09	6.77	3.26	2.07	0.17

FIGURES



Fig. 1 Inflorescence (A) and pollinators, Halictidae sp. (A), *Frieseomelitta doederleini* Friese (B) and *Trigona spinipes* Fabricius (C) of *Rhynchospora ciliata* (Vahl) Kük., at the Jardim Botânico do Recife, in Pernambuco, Brazil.

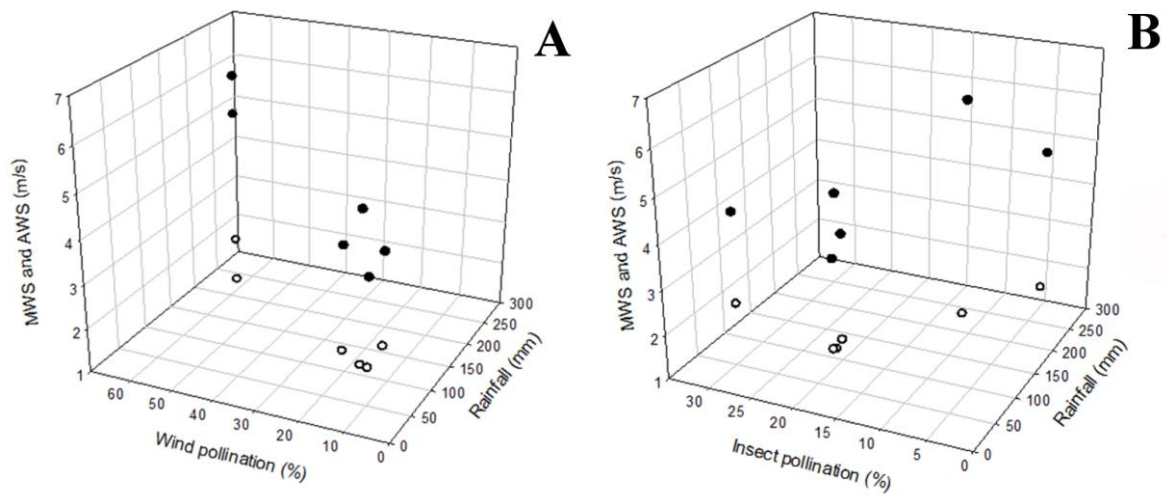


Fig. 2 Relation between the wind (A) and insects (B) contribution to reproductive success (fruit set) of *Rhynchospora ciliata* (Vahl) Kük. under different environmental conditions, such as rain and maximum wind speed (MWS) (closed circle) and rain and average wind speed (AWS) (open circle).

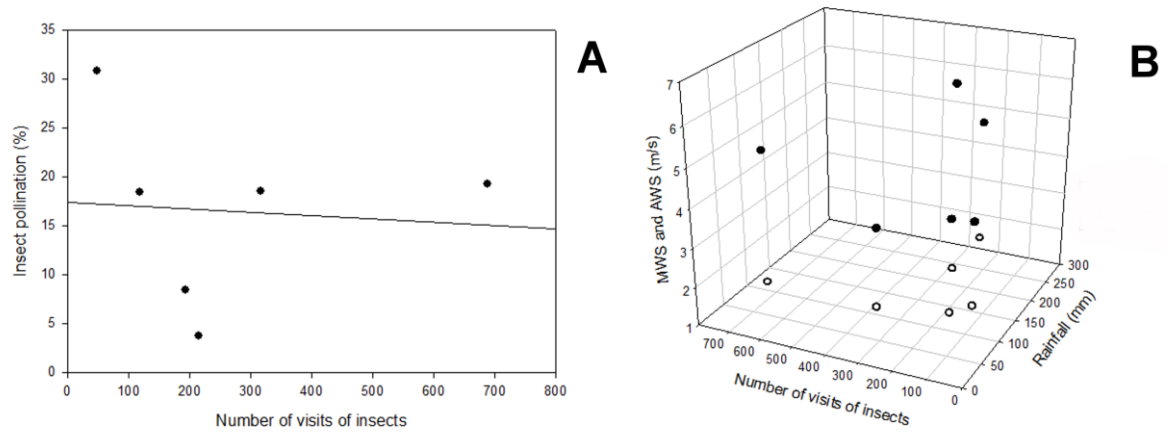


Fig. 3 Relation between number of visits and the contribution of insects to reproductive success (fruit set) in *Rhynchospora ciliata* (Vahl) Kük (A), and between number of visits under different environmental conditions, such as rain and maximum wind speed (MWS) (closed circle) and rain and average wind speed (AWS) (open circle) (B).

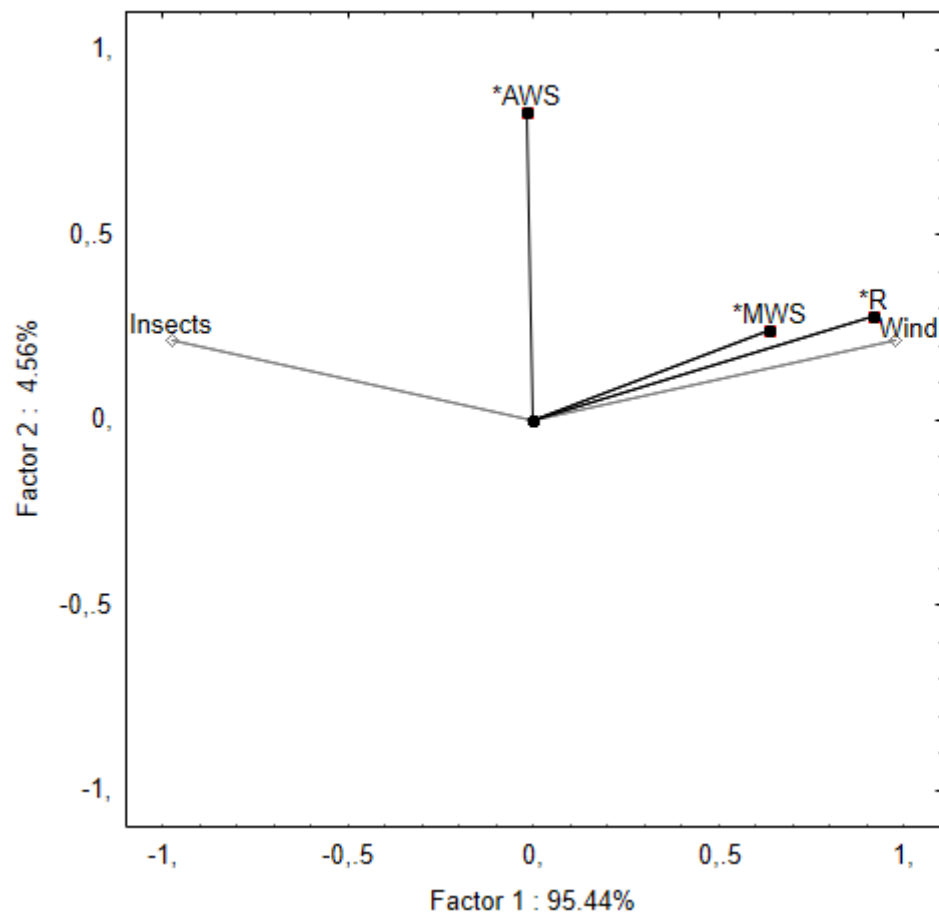


Fig. 4 PCA analysis of the influence of environmental variables: rain, maximum wind speed (MWS) and average wind speed (AWS) to the reproductive success of *Rhynchospora ciliata* (Vahl) Kük. by wind and insects.

6 GANGORRA NA POLINIZAÇÃO DE *RHYNCHOSPORA CEPHALOTES* (L.) VAHL. (CYPERACEAE): INFLUÊNCIA DA LOCALIZAÇÃO DAS PLANTAS NO PAPEL DO VENTO E DE INSETOS COMO VETORES DE PÓLEN

Ana Carolina Galindo da Costa, William Wayt Thomas, Isabel Cristina Machado

A. C. G. Costa

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Av. da Engenharia, S/n - Cidade Universitária, 50740-600, Recife, Pernambuco, Brazil.

W. W. Thomas

The New York Botanical Garden, 200th St. & Southern Blvd., Bronx, New York, 10458, U.S.A

I. C. Machado

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Av. da Engenharia, S/n - Cidade Universitária, 50740-600, Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail: imachado@ufpe.br

Tel.: +55 81 2126-8945

Manuscrito a ser enviado ao periódico Ecological Research

RESUMO

Ambofilia (polinização pelo vento e insetos) tem sido reportada para alguns gêneros de Cyperaceae, família considerada essencialmente anemófila, tais como em *Rhynchospora*. Ação dos vetores de pólen pode variar dependendo das condições microclimáticas locais em um fragmento florestal. *Rhynchospora cephalotes* é uma espécie ambófila que apresenta indivíduos localizados em borda e interior de fragmentos florestais, que estão sob diferentes condições microclimáticas. Portanto, este estudo teve como objetivo verificar a participação dos vetores biótico e abióticos de pólen no sucesso reprodutivo de indivíduos de *R. cephalotes* localizados na borda e no interior de mata. Testamos a hipótese de que há maior participação do vento na polinização dos indivíduos localizados na borda e maior participação dos insetos na polinização dos indivíduos localizados no interior de mata. As observações de campo foram realizadas em um fragmento de Floresta Atlântica na Reserva Biológica de Guaribas, Paraíba, NE do Brasil, sendo quantificadas as visitas de insetos, a velocidade do vento e testado o sucesso reprodutivo de indivíduos de *R. cephalotes* localizados na borda e no interior da mata. Confirmando nossa hipótese, verificamos menor número de visitas de abelhas polinizadoras nos indivíduos localizados na borda da mata, onde a velocidade do vento foi significativamente maior que a existente no interior. Abelhas foram os vetores de pólen que mais contribuíram para a formação de frutos (73.3%) dos indivíduos localizados interior de mata, já o vento foi o principal vetor para os indivíduos da borda da mata (76.6% dos frutos formados). Essa gangorra na troca de liderança dos papéis desempenhados por cada vetor de pólen, nos dois tipos de ambientes testados, garante elevada produção de frutos de *R. cephalotes* em qualquer dos ambientes do fragmento florestal.

Palavras-chave: ambofilia; Cyperaceae; efeito de borda; fragmento florestal; *Rhynchospora*;

INTRODUÇÃO

Ambofilia (polinização por vento e por insetos) é um sistema de polinização misto que tem sido registrado para diversas espécies de Cyperaceae, família considerada tipicamente anemófila (polinizada pelo vento) (Wragg e Johnson 2011; Costa e Machado 2012; Costa *et al.* em prep.; capítulo 1 desta tese). Neste sistema de polinização as espécies apresentam atributos que podem ser considerados atrativos para insetos, tais como emissão de voláteis florais, brácteas involucrais e/ou florais brancas, anteras brancas ou amarelas, bem como possuem estruturas adaptadas à polinização pelo vento, como anteras com grande quantidade de grãos de pólen, secos, e estigma exposto, com grande área superficial que facilita a coleta de grãos de pólen no ar (Leppik 1955; Culley *et al.* 2002; Wragg e Johnson 2011; Costa e Machado 2012; Yamasaki e Sakai 2013; Ríos *et al.* 2014; Costa *et al.* em prep.; capítulo 5 desta tese).

A ambofilia pode ser considerada um sistema de polinização estável, em que ambos, vento e insetos, podem atuar de forma combinada para aumentar o sucesso reprodutivo da espécie de maneira que a formação total de frutos é maior quando ambos os vetores estão atuando (Culley *et al.* 2002; Costa e Machado 2012; Costa *et al.* em prep.; capítulo 1 desta tese). Segundo Linder (1998), em espécies ambófilas, embora as flores sejam visitadas e polinizadas por insetos, grande quantidade de pólen é dispersa pelo vento e, se por alguma razão um dos vetores de polinização faltar, como os insetos, o outro pode ocorrer de forma que a presença de atributos para a polinização pelo vento, mesmo ao custo de uma polinização biótica efetiva, constituiria uma vantagem seletiva. Em um estudo sobre a variação temporal da participação dos vetores de pólen de *Rhynchospora ciliata*, uma espécie ambófila de Cyperaceae, Costa *et al.* (em prep.; capítulo 3 da tese) verificaram que a contribuição do vento e dos insetos para a formação de frutos é bastante variável, dependendo de fatores climáticos, sendo o vento e a chuva variáveis ambientais importantes para determinação do principal vetor de pólen.

Além das variações temporais presentes em um ecossistema, há também variações microclimáticas, que podem ser graduais em fragmentos florestais, da borda até o interior, influenciando nas interações ecológicas (Rodrigues 1998a, 1998b; Chen *et al.* 1999; Davies-Colley *et al.* 2000). Alterações microclimáticas próximas da borda de um fragmento podem modificar ou prejudicar funções ecossistêmicas devido ao aumento de luz e temperatura, que podem, por exemplo, limitar a presença de insetos; além disso, ventos mais fortes e baixa

umidade são característicos da borda e podem interferir em processos ecológicos (Rodrigues 1998a, 1998b; Chen *et al.* 1999).

Rhynchospora cephalotes (L.) Vahl., outra espécie ambófila de Cyperaceae (Costa *et al.* em prep.; e capítulo 1 desta tese), apresenta indivíduos distribuídos na borda e no interior de fragmentos florestais. Utilizando esta espécie como modelo, esse estudo teve como objetivo verificar e comparar a participação dos vetores biótico e abióticos de pólen no sucesso reprodutivo de indivíduos que se encontram nos dois diferentes ambientes. Além disso, testamos a hipótese de que há maior participação do vento na polinização dos indivíduos de *R. cephalotes* localizados na borda e maior participação dos insetos na polinização dos indivíduos localizados no interior de mata.

MÉTODOS

Local de estudo e espécie estudada

Este estudo foi realizado em um remanescente de Floresta Atlântica, na Reserva Biológica de Guaribas, no fragmento florestal Sema 2, uma área de 3.378,2 ha, localizado no município de Mamanguape, Paraíba (06°40'40" e 06°44'59" S, 41°12'47" e 41°07'11" W). As observações de campo se estenderam por três anos, de novembro de 2013 à fevereiro de 2015, durante os meses de floração da espécie, que abrange os meses de dezembro a julho. A borda da mata foi determinada segundo recomendação de Rodrigues (1998a, b), que aponta que os efeitos de borda, tais como alta incidência de luz e baixa umidade são minimizados a partir de 35 metros de distância da margem do fragmento florestal. Portanto, após 35 metros de distância da beira do fragmento consideramos como interior da mata. Contudo, para testar a hipótese deste estudo, os indivíduos utilizados nos experimentos da borda foram escolhidos em até 10 metros de distância da beira do fragmento para que os efeitos da borda fossem máximos. Já os indivíduos de interior de mata foram escolhidos após 100 metros da borda do fragmento para evitar ao máximo qualquer efeito de borda.

Rhynchospora cephalotes é uma espécie nativa que ocorre em matas umidas e semidecíduas e nas bordas das mesmas em toda América tropical (Alves *et al.* 2015, Thomas 1994). A antese se inicia por volta das 07:00 horas, com exposição gradual das anteras e estigmas, que se torna receptivo às 08:00 h, e termina às 12:00 horas, caracterizada pela queda das anteras e ausência de receptividade do estigma. *R. cephalotes* apresenta inflorescência terminal do tipo capítulo formado por espiguetas compostas de 4 a 8 flores aclamídeas e bissexuais. Dentre os atributos florais considerados atrativos para insetos estão a emissão de

odor intenso e doce, a coloração branca das anteras. A exposição das anteras que produzem grande quantidade de grãos de pólen (ca. de $11.240,4 \pm 292.7$) e o estigma bífido, cuja área receptiva facilita a polinização pelo vento. Três espécies de abelhas polinizam *R. cephalotes*, sendo *Plebeia* sp. a mais frequente (58.9%), seguida por *Trigona spinipes* (21.2%) e uma espécie da família Halictidae (19.9%) (Costa *et al.* em prep.; capítulo 1 desta tese) (Fig. 1).

Visitantes florais

Para testar a hipótese deste estudo foi contabilizada a quantidade de visitas de polinizadores bióticos em indivíduos localizados no interior e na borda da mata, sendo para cada ambiente delimitada uma área de 1m^2 . Nesta área amostral foram então quantificadas as visitas às flores de *R. cephalotes* durante todo o período de antese, das 0800 às 1500 hs, durante seis dias em cada ambiente, totalizando 42 horas de observação em cada área. Além disso, foi analisado o comportamento dos insetos nas flores, classificando os visitantes como pilhadores, polinizadores eventuais e polinizadores efetivos, de acordo com o local e frequência de contato com as estruturas reprodutivas das flores no corpo dos insetos. Possíveis diferenças de quantidade de visitas de insetos entre as localidades foram verificadas através do teste t, $\alpha=0.01$. Os dados foram previamente testados quanto à normalidade e homocedasticidade utilizando o teste de Lilliefors. Para este e demais testes estatísticos utilizamos o programa BioEstat 5.3 (Ayres *et al.* 2007).

Velocidade do vento

A velocidade do vento foi medida na borda e no interior de mata utilizando um anemômetro digital portátil (TFA 7607.01.0.00, Alemanha). As medidas de vento foram tomadas no período da manhã, após o início da antese de *R. cephalotes*, entre 08:00 e 10:00 hs, posicionando o anemômetro na altura das inflorescências (entre 40 e 60 cm da altura a partir do solo). No total foram feitas 30 medidas de vento para cada área em dois dias diferentes, sendo coletadas 15 medidas por dia para cada ambiente. Possíveis diferenças de velocidade do vento entre as áreas (borda vs interior) foram verificadas através do teste t, $\alpha=0.01$. Os dados foram previamente testados quanto à normalidade e homocedasticidade utilizando o teste de Lilliefors e devido à não normalidade dos dados e heterocedasticidade, os dados foram transformados em logaritmos na base 2.

Sistema de polinização

Para definir o principal vetor de polinização de *R. cephalotes* na borda e no interior da mata foram realizados os seguintes experimentos, seguindo os protocolos de Costa & Machado (2012), em pelo menos 10 indivíduos diferentes para cada tratamento: (1) autopolinização espontânea, no qual inflorescências com botões em pré-antese foram encobertas com papel semi-impermeável, impedindo a ação do vento e de insetos; (2) Polinização pelo vento, no qual inflorescências foram ensacadas com tecido cuja malha tem abertura que permitia a passagem dos grãos de pólen, mas não de insetos; e (3) Polinização natural (controle), no qual inflorescências foram deixadas expostas em condições naturais para serem polinizadas pelos vetores de pólen, bióticos e/ou abióticos. Comparando (1) com (2) pode-se inferir a participação do vento, e (3) com (2) e (1) a participação dos insetos no sucesso reprodutivo.

Para analisar o papel de cada vetor de pólen dentro de cada ambiente (borda e interior) e a possível diferença entre os tratamentos 1, 2 e 3 foi realizado teste Qui-quadrado. Para verificar diferenças nos sistemas de polinização, anemofilia e entomofilia, entre indivíduos de interior e borda de mata foi aplicada uma tabela de contingência 2 x 2. Para isto, 1) utilizamos os valores de formação de fruto por cada vetor de pólen, excluindo a formação de frutos por autopolinização espontânea, para quantificar os frutos formados pela polinização pelo vento, e 2) excluimos a formação de frutos por autopolinização espontânea e pelo vento, para quantificar os frutos formados pela ação dos insetos. Considerou-se $\alpha=0.01$. Ambos os tratamentos foram realizados durante todo o período de floração da espécie, entre os meses de dezembro à abril de 2014.

RESULTADOS

Visitantes florais

Flores de *Rhynchospora cephalotes* são visitadas por abelhas durante todo o período de antese, das 08:00 às 12:00 hs e por todo período de floração. As três espécies de abelhas polinizadoras foram observadas tanto em indivíduos localizados na borda como no interior da mata, contudo, a quantidade média de visitas total das três abelhas nas flores dos indivíduos da borda (16.5 ± 6.74 visitas por dia em um agrupamento) foi significativamente menor do que a quantidade de visitas das abelhas nas flores dos indivíduos localizados no interior da mata (36.83 ± 7.46) ($t = 4.94$; gl.=10; $p < 0.01$) (Fig. 1 B e Fig. 2).

Velocidade do vento

A velocidade do vento variou bastante entre a borda e o interior da mata. Na borda, a velocidade média do vento foi de 6.16 ± 1.66 km/h, alcançando máxima de 10.7 km/h., enquanto no interior da mata, a velocidade do vento foi de 3.5 ± 0.65 km/h, com máxima de 5.3 km/h, velocidade significativamente menor do que na borda ($t = 10.10$; gl.= 58; $p < 0.01$).

Sistema de polinização

A partir dos experimentos realizados para verificar a participação de cada vetor de pólen verificou-se que nos indivíduos localizados na borda da mata há diferenças significativas entre os tratamentos de autopolinização espontânea e polinização pelo vento (autopolinização espontânea vs autopolinização espontânea + polinização pelo vento: $\chi^2 = 19.36$; gl.=1; $p < 0.01$). Porém, não houve diferença significativa entre polinização pelo vento e o controle (autopolinização espontânea + polinização pelo vento vs autopolinização espontânea + polinização pelo vento + polinização por insetos: $\chi^2 = 0.3$; gl.= 1; $p = 0.58$). Portanto, o vento é principal vetor de pólen dos indivíduos de *R. cephalotes* localizados na borda do fragmento florestal (tabela 1).

Já nos indivíduos de *R. cephalotes* localizados no interior da mata o vento não foi um vetor de pólen eficiente, não havendo diferença significativa entre a autopolinização espontânea e a polinização pelo vento (autopolinização espontânea vs autopolinização espontânea + polinização pelo vento: $\chi^2 = 2.27$; gl.=1; $p = 0.22$). Contudo os insetos foram os principais vetores de pólen destes indivíduos no interior da mata (autopolinização espontânea + polinização pelo vento vs autopolinização espontânea + polinização pelo vento + polinização por insetos: $\chi^2 = 10.3$; gl.= 1; $p < 0.01$) (tabela 1).

A partir da tabela de contingência (tabela 2) foi possível verificar essa gangorra de sistemas de polinização, na qual anemofilia é o principal sistema de polinização nos indivíduos localizados na borda, enquanto entomofilia é o principal sistema dos indivíduos localizados no interior da mata ($\chi^2 = 14.09$; gl.=1; $p < 0.01$).

DISCUSSÃO

A variação espacial da participação dos vetores de pólen na reprodução de *Rhynchospora cephalotes* é um dado que nos permite entender a importância do estabelecimento da ambofilia em espécies de famílias tipicamente anemófilas, como Cyperaceae. Na literatura ainda não está evidente se a ambofilia é um estágio intermediário na

transição da anemofilia para uma total entomofilia ou se é um sistema de polinização estável (Friedman e Barret 2009). Neste estudo, a confirmação da participação do vento como principal vetor nos indivíduos localizados na borda e dos insetos nos indivíduos localizados no interior de mata, reforça os dados de Costa *et al.* (em prep.; capítulo 3 desta tese). Os autores (Costa *et al.*, em prep.; capítulo 3 desta tese) verificaram que a atuação do vento e insetos depende das condições ambientais locais, de forma que um vetor pode compensar a ausência ou a baixa formação de frutos do outro, sendo indicativos de que a ambofilia é um sistema de polinização estável, visto que uma espécie pode se beneficiar de ambos os vetores de pólen, mesmo que em momentos ou locais diferentes.

A ambofilia pode ser mais comum em florestas tropicais e subtropicais do que se pensava anteriormente devido à sua vantagem em assegurar a reprodução sob condições variadas (Yamasaki e Sakai 2013; Gong *et al.* 2016). Além disso, quando atuam juntos, o vento e os insetos podem produzir mais frutos do que cada sistema de polinização separadamente (Culley *et al.* 2002; Costa e Machado 2012; Costa *et al.*, em prep.; capítulo 1 da tese). Outra evidência do caráter positivo desta estratégia é o fato de a ambofilia ter surgido diversas vezes de forma independente em diferentes famílias de plantas (Rech *et al.* 2014).

A frequência de visitas mais baixa nos indivíduos de *R. cephalotes* localizados na borda da floresta pode estar relacionada aos efeitos de borda. A maioria dos estudos realizados sobre a influencia do efeito de borda atuando nas relações planta – polinizador indicam efeitos negativos (Burgess *et al.* 2006; Hadley e Betts 2012), sendo raramente positivas ou neutras (Burgess *et al.* 2006). Os insetos são susceptíveis aos efeitos de fragmentação, podendo haver mudanças na riqueza, composição, abundância e comportamento de várias guildas de polinizadores (Didham *et al.* 1996; Viana *et al.* 2012). A fragmentação pode afetar, portanto, de forma indireta as interações planta - polinizador e o comportamento dos insetos, resultando em baixa formação de frutos (Aizen e Feinsinger 1994; Didham *et al.* 1996; Hadley e Betts 2012). Além disso, quanto maior a distância do fragmento em direção à matriz menor a diversidade a abundância de insetos e, conseqüentemente, menor será a frequência de visitas (Chacoff e Aizen 2006; Bailey *et al.* 2014).

A alta velocidade do vento medida na borda do fragmento é comum para ambientes abertos, quando comparada com ambientes mais fechados, como interior de florestas (Rodrigues 1998a, 1998b; Davies-Colley *et al.* 2000; Damschena *et al.* 2014). Esta alta velocidade do vento, uma das condições ambientais importantes para a ocorrência da polinização pelo vento (Friedman e Barrett 2009; Costa *et al.* em prep.; capítulo 3 desta tese)

pode estar relacionada à alta formação de frutos nos indivíduos de *R. cephalotes* no experimento de polinização pelo vento. Desta forma, a participação dos insetos, que foram pouco frequentes, não foi importante para os indivíduos localizados na borda da mata.

Já no interior da floresta, em que há baixa velocidade de vento, este não contribuiu para a formação de frutos, diferentemente do encontrado por Anderson *et al.* (1988), na palmeira *Attalea speciosa* Mart. Ex Spreng. (= *Orbignya phalerata* Mart.) que verificou que a polinização pelo vento ocorreu na borda e no interior da floresta, sendo, contudo, mais importante nos indivíduos da borda da mata. No ambiente mais fechado, os efeitos de borda são ausentes ou minimizados (Rodrigues 1998a, 1998b; Davies-Colley *et al.* 2000; Damschena *et al.* 2014), permitindo que os insetos ocorram em maior abundância e riqueza (Didham *et al.* 1996), desta forma, os insetos puderam contribuir mais para formação de frutos dos indivíduos de *R. cephalotes* localizados no interior da mata.

Portanto, neste estudo concluímos que essa gangorra de troca de liderança nos papéis desempenhados por cada vetor de pólen, nos dois tipos de ambientes testados, sendo maior pelo vento na borda e maior pelos insetos no interior da mata, garante elevada e equivalente produção de frutos dessa espécie de *Rhynchospora* nos dois ambientes do fragmento florestal.

AGRADECIMENTOS

À FACEPE pela bolsa de Doutorado para ACGC (IBPG-0452-2.05/10). Ao CNPq pela bolsa de Produtividade a ICM e suporte financeiro (Edital Universal 459485/2014-8) e ao National Science Foundation (DEB-0946618) para WWT pela assistência de campo. À Reserva Biológica de Guaribas por permitir a pesquisa no local e aos brigadistas e mateiros da reserva pela campanha e ajuda em campo. À Dr. Patrícia Lima e MSc. Gabriela Punto pela ajuda em campo.

REFERÊNCIAS

- Aizen MA, Feinsinger P (1994) Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a Chaco dry forest, Argentina. *Ecology* 75:330-351.
- Alves M, Hefler SM, Trevisan R, Silva Filho PJS (2015) *Rhynchospora*. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7264>. Accessed 15 December 2016.

- Anderson AB, Overall WL, Henderson A (1988) Pollination ecology of a forest-dominant palm (*Orbignya phalerata* Mart.) in Northern Brazil. *Biotropica* 20:192-205.
- Ayres M, Ayres MJr, Ayres DL, Santos AS (2007) BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSMM/MCT/CNPq, Belém.
- Bailey S, Requier F, Nusillard B, Roberts SPM, Potts SG, Bouget C (2014) Distance from forest edge affects bee pollinators in oilseed rape fields. *Ecology & Evolution* 4: 370–380.
- Burgess VJ, Kelly D, Robertson AW, Ladley JJ (2006) Positive effects of forest edges on plant reproduction: literature review and a case study of bee visitation to flowers of *Peraxilla tetrapetala* (Loranthaceae). *New Zealand Journal of Ecology* 30:179-190.
- Chacoff NP, Aizen MA (2006) Edge effects on flower-visiting insects in grapefruit plantations bordering premontane subtropical forest. *Journal of Applied Ecology* 43:18-27.
- Chen J, Saunders SC, Crow TR, Naiman RJ, Broszofski KD, Mroz GD, Brookshire BL, Franklin JF (1999) Microclimate in forest ecosystem and landscape ecology. *BioScience* 49:288-297.
- Costa ACG, Machado IC (2012) Flowering dynamics and pollination system of the sedge *Rhynchospora ciliata* (Vahl) Kükenth (Cyperaceae): does ambophily enhance its reproductive success? *Plant Biology* 14:881-887.
- Costa ACG, Thomas W, Machado IC (submetido). Comparative floral biology of *Rhynchospora ciliata* (Vahl) Kükenth and *R. pubera* (Vahl) Boeckeler (Cyperaceae): the role of white involucral bracts in attracting pollinating insects. *Plant Species Biology*.
- Culley TM, Weller SG, Sakai AK (2002) The evolution of wind pollination in angiosperms. *Ecology & Evolution* 17:361-369.
- Damschena EI, Dirk V, Bakera DV, Bohrerb G, Nathanc R, Orrocka JL, Turner JR, Brudvige LA, Haddadf NM, Leveyg DJ, Tewksburyh JJ (2014) How fragmentation and corridors affect wind dynamics and seed dispersal in open habitats. *PNAS* 111: 3484–3489.
- Davies-Colley R, Payne G, Van Elswijk M (2000). Microclimate gradients across a forest edge. *New Zealand Journal of Ecology* 24:111-121.
- Didham RK, Ghazoul J, Stork NE, Davis AJ (1996) Insects in fragmented forests: a functional approach. *Tree* 11:255-258.
- Friedman J, Barrett SCH. 2009. The consequences of monoecy and protogyny for mating in wind-pollinated *Carex*. *New Phytol* 181:489-497.

- Gong YB, Yang M, Vamosi JC, Yang HM, Mu WX, Liu JK, Wan T (2016). Wind or insect pollination? Ambophily in a subtropical gymnosperm *Gnetum parvifolium* (Gnetales). *Plant Species Biology* 31:272–279.
- Hadley AS, Betts MG (2012) The effects of landscape fragmentation on pollination dynamics: absence of evidence not evidence of absence. *Biological Reviews* 87:526–544.
- Leppik EE (1955) *Dichromena ciliata*, a noteworthy entomophilous plant among Cyperaceae. *American Journal of Botany* 42:455- 458.
- Linder H P (1998) Morphology and the evolution of wind pollination. In: Owens SJ, Rudall PJ (eds) *Reproductive biology in systematics, conservation and economic botany*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Rech AR, Bergamo PJ, Figueiredo RA (2014) Polinização Abiótica. In: Rech AR, Agostini K, Oliveira PE, Machado IC (eds) *Biologia da Polinização*. Projeto Cultural, Rio de Janeiro.
- Ríos LD, Fuchs EJ, Hodel DR, Cascante-Marín A (2014) Neither insects nor wind: ambophily in dioecious *Chamaedorea* palms (Arecaceae). *Plant Biology* 16:702-710.
- Rodrigues E (1998a) Edge effects on the regeneration of fragments in south Brazil. PhD Thesis, Harvard University.
- Rodrigues E (1998b) Efeito de bordas em fragmentos de floresta. *Cadernos da Biodiversidade* 1:1-5.
- Thomas, W. W. 1994. *Rhynchospora*, Cyperaceae. Pp. 404-422 In: G. Davidse, M. Sousa S. and A. O. Chater (general eds.), *Flora Mesoamericana*, Volumen 6, Alismataceae to Cyperaceae. Inst. de Biología, Univ. Nacional Autónoma de México, México.
- Viana BF, Boscolo D, Mariano Neto E, Lopes LE, Lopes AV, Ferreira PA, Pigozzo CM, Primo LM (2012) How well do we understand landscape effects on pollinators and pollination services? *Journal of Pollination Ecology* 7:31-41.
- Wragg PD, Johnson SD (2011) Transition from wind pollination to insect pollination in sedges: experimental evidence and functional traits. *New Phytologist* 191:1128-1140.
- Yamasaki E, Sakai S (2013). Wind and insect pollination (ambophily) of *Mallotus* spp. (Euphorbiaceae) in tropical and temperate forests. *Australian Journal of Botany* 61:60-66.

TABELAS

Tabela 1. Sucesso reprodutivo (SR) de indivíduos de *Rhynchospora cephalotes* localizados na borda e no interior da mata da Reserva Biológica de Guaribas, no NE do Brasil, submetidos a diferentes tratamentos AE: autopolinização espontânea, PN: polinização natural (controle), PV: polinização pelo vento (+AE). Diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos em cada ambiente.

Ambiente	Tratamento	Inflorescência	flor	fruto	SR (%)
Borda	AE ^a	13	30	1	3.333333
	PV ^b	11	30	24	80
	CO ^b	12	30	29	96.66667
Interior	AE ^a	14	30	3	10
	PV ^a	10	30	8	26.66667
	CO ^b	11	30	27	90

Tabela 2. Frutos formados por ação do vento e de insetos em indivíduos de *Rhynchospora cephalotes* localizados na borda e no interior da mata da Reserva Biológica de Guaribas, no NE do Brasil.

Sistema de polinização/ Ambiente	Borda	Interior
Polinização pelo vento	24 (76.6%*)	8 (16.6%*)
Polinização por insetos	5 (20%*)	19 (73.3%*)

*Entre parênteses a porcentagem de frutos formada apenas pelo vetor de pólen (vento ou insetos)

FIGURAS

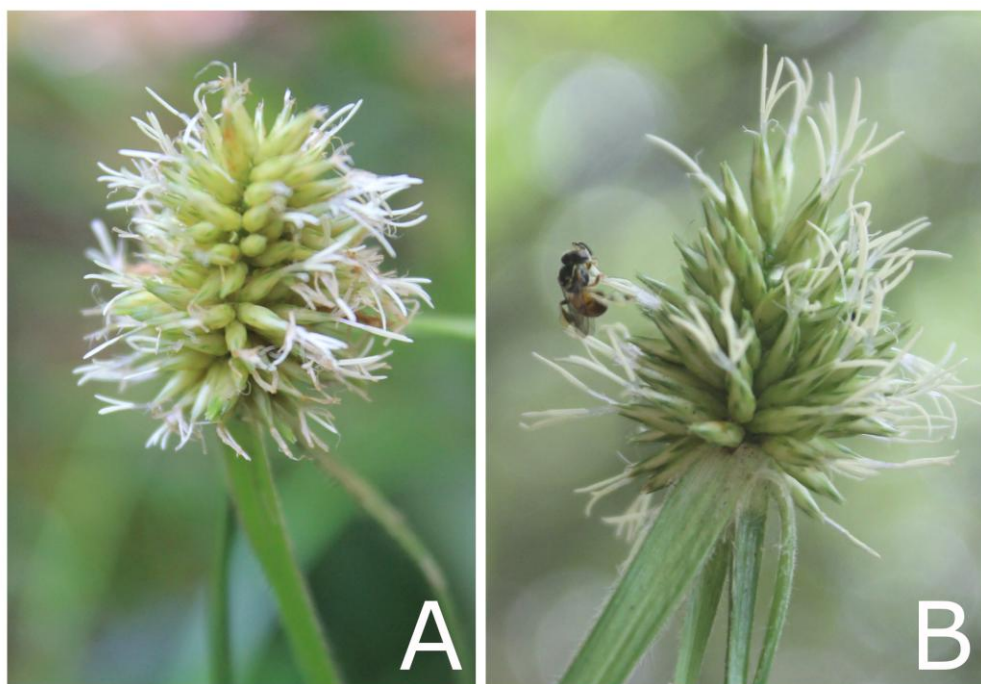


Figura 1. Inflorescência de *Rhynchospora cephalotes* (A) e registro de visita de abelha *Plebeia* sp. (B).

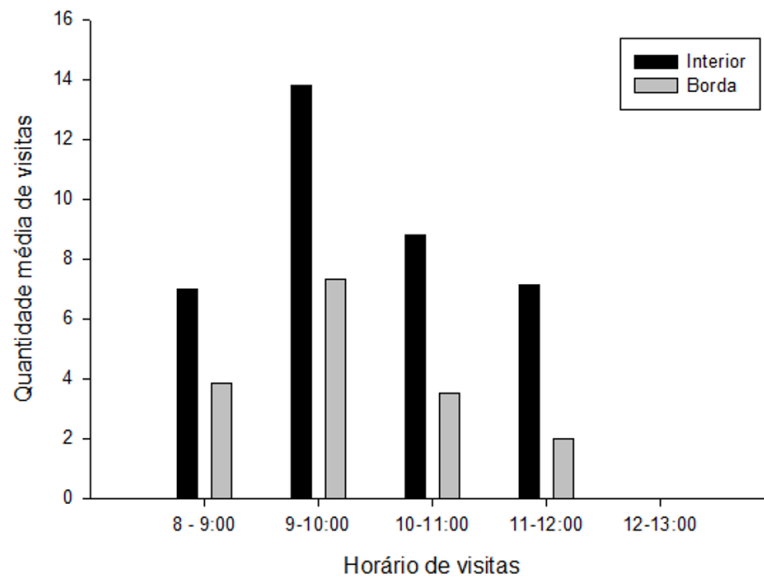


Figura 2. Quantidade média de visitas em *Rhynchospora cephalotes* na borda e no interior da mata da Reserva Biológica de Guaribas, em Mamanguape, Paraíba, Brasil.

7 RECONSTRUÇÃO ANCESTRAL DOS ATRIBUTOS FLORAIS E REPRODUTIVOS NA TRIBO RHYNCHOSPOREAE (CYPERACEAE): UMA ADAPTAÇÃO À ENTOMOFILIA?

Ana Carolina Galindo da Costa¹, Diego Sotero de Barros Pinangé², Christopher E. Buddenhagen³, William Wayt Thomas⁴, Isabel Cristina Machado^{1*}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Recife, Pernambuco, Brazil.

³Department of Biological Science, The Florida State University, Tallahassee, Florida, U.S.A..

⁴The New York Botanical Garden, Bronx, New York, U.S.A.

*corresponding author: imachado@ufpe.br

Manuscrito a ser enviado ao periódico Botanical Journal of the Linnean Society

RESUMO

A tribo *Rhynchosporaeae* (*Rhynchospora* + *Pleurostachys*) pertence a uma família essencialmente anemófila, contudo, atributos florais anemófilos estão presentes no grupo. A análise destes atributos associados aos sistemas de polinização da tribo permite entender e estimar a história evolutiva sobre o surgimento destes caracteres. Portanto, este estudo teve como objetivo realizar a reconstrução ancestral de caracteres relacionados à anemofilia e a entomofilia na Tribo *Rhynchosporaeae*. Para isso, uma árvore filogenética foi construída a partir de sequências trnL/F utilizando análise de Máxima verossimilhança. Atributos florais relacionados à anemofilia e entomofilia foram observados em três réplicas de 79 espécies da tribo *Rhynchosporaeae* e em duas espécies de *Carex*, grupo irmão e foram mapeados na árvore filogenética a partir de análises de Máxima verossimilhança e Inferência Bayesiana. Foi possível verificar que o monofiletismo da tribo com suporte significativo (BS = 100; PP = 1.0), incluindo *Pleurostachys* dentro do gênero *Rhynchospora*. Os nós mais ancestrais, não sendo possível realizar inferências mais profundas sobre relações entre os quatro principais clados, A, B, C e D, no entanto dentro os clados, os nós terminais apresentaram suporte significativo. A partir da análise de reconstrução verificamos que os atributos relacionados à anemofilia foram indicados como plesiomórficos na tribo. Já os atributos relacionados à entomofilia surgiram múltiplas vezes de forma independente nos quatro clados, e predominantemente nos clados A, B e C, especificamente e de maneira mais definida uma linhagem dentro do clado B que apresentou um conjunto de características apomórficas relacionados a entomofilia. Portanto, neste estudo foi possível indicar uma hipótese provável sobre o surgimento dos atributos entomófilos na tribo *Rhynchosporaeae*, pertencente a uma família anemófila.

Palavras-chave: anemofilia, Cyperaceae, entomofilia, polinização, reconstrução ancestral de caráter

INTRODUÇÃO

A polinização pelo vento (anemofilia) evoluiu ao menos 65 vezes nas angiospermas, a partir de ancestrais que apresentavam polinização biótica (Linder, 1998), observada em 60 famílias e representando 16% das famílias de angiospermas (Ackerman, 2000). Anemofilia é descrita como sendo uma síndrome de polinização em que os representantes possuem atributos florais que podem favorecer a polinização pelo vento, minimizando o custo energético da manutenção de atributos atrativos para insetos (Faegri & Pijl, 1979; Endress, 1994; Ackerman, 2000)

Na ordem Poales, a anemofilia é considerada uma condição derivada, tendo evoluído diversas vezes no grupo; no entanto, na família Cyperaceae esta estratégia é considerada uma característica plesiomórfica (Givnish *et al.*, 2010; Wolowski & Freitas, 2015). Dentre as principais características desta família estão flores inconspícuas, agrupadas em espiguetas e organizadas em inflorescências do tipo panícula ou capítulo, com perianto ausente, sem odor, sem nectário, e exposição de anteras, que apresentam abundantes grãos de pólen, pequenos e estigma ramificado, com grande área receptiva (Leppik, 1955; Whitehead, 1969; Endress 1994; Ackerman, 2000; Cruden, 2000; Givnish *et al.*, 2010).

A transição da polinização por inseto para a polinização pelo vento tem sido considerada irreversível, pois os caracteres perdidos característicos de uma polinização biótica, como odor e néctar, seriam dificilmente recuperados dada a sua complexidade (Culley *et al.*, 2002). Contudo, atributos que podem estar relacionados à entomofilia tem sido registrados para gêneros de Cyperaceae, como por exemplo, em *Rhynchospora* (Vahl) (Leppik, 1955; Thomas, 1984; Costa & Machado, 2012; Costa *et al.*, em prep.; capítulo 1 desta tese), em *Cyperus* por Wragg & Jonhson (2011) e em *Eleocharis* por Magalhães *et al.* (2005). Entre as características observadas por esses autores que sugerem essa adaptação estão as brácteas involucrais verdes com manchas brancas e brácteas florais brancas, amarelas e laranja.

Rhynchospora é um dos maiores gêneros pertencente à família Cyperaceae, com ca. de 250 espécies distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do mundo (Guaglianone, 2001; Strong, 2006). É considerado cosmopolita, e apresenta centro de distribuição nas Américas, primariamente em zonas temperadas quentes e nos Neotrópicos (Strong, 2006). No Brasil, é considerado o gênero de maior riqueza em Cyperaceae, com 157 espécies, das quais 40 são endêmicas (Luceño, Alves & Mendes, 1997; Alves *et al.*, 2009). Os gêneros *Rhynchospora* e *Pleurostachys* formam a tribo (Thomas, Araujo & Alves, 2009; Buddenhagen, Thomas &

Mast, no prelo). Análises filogenéticas indicam que *Pleurostachys* está inserido dentro do gênero *Rhynchospora*, formando um grupo monofilético com suporte significativo, formando a tribo Rhynchosporeae (Thomas *et al.*, 2009; Buddenhagen *et al.*, no prelo). Assim, há diversas sinapormofias presentes entre *Pleurostachys* e espécies de *Rhynchospora*, como por exemplo a presença de diversas inflorescências auxiliares em um escapo floral, ao invés de uma inflorescência terminal (Thomas *et al.*, 2009).

Os primeiros registros de classificação em *Rhynchospora* se basearam nas morfologias das inflorescências e flores, embora sejam características homoplásticas e bastante variáveis (Strong, 2006). Lucero *et al.* (2014) realizaram uma análise de reconstrução ancestral de caracteres florais em *Rhynchospora* e verificaram que a evolução de diferentes morfologias de flores e inflorescências no gênero estão relacionadas ao tipo de sistema de polinização. Contudo, os autores (Lucero *et al.*, 2014) analisaram apenas nove espécies do gênero e não levaram em consideração atributos que podem ser considerados atrativos, como brácteas involucrais e florais.

Segundo Thomas (1984), estimar a história evolutiva dentro de *Rhynchospora* é particularmente importante porque provê ideias sobre como caracteres morfológicos encontrados em plantas entomófilas podem ter surgido. Portanto, o presente estudo teve como objetivo realizar a reconstrução ancestral de caracteres que podem estar relacionados à anemofilia e a entomofilia na Tribo Rhynchosporeae. Deste modo, neste estudo foram incluídos 20% dos táxons da tribo (79 espécies), abrangendo todas as variações taxonômicas, morfológicas, ecológicas e geográficas de acordo com Buddenhagen *et al.* (no prelo). Assim, a partir das análises propostas buscou-se verificar quais características podem ser consideradas mais plesiomórficas e quais são as mais apomórficas, traçando a evolução destes caracteres dentro do grupo relacionados às síndromes de polinização.

METODOLOGIA

Táxons, sequenciamento e alinhamento

Para as reconstruções realizadas neste estudo foram consideradas as mesmas espécies e acessos genéticos utilizados por Buddenhagen *et al.* (no prelo), alguns dos quais foram publicados por Thomas *et al.* (2009) (Anexo - Tabela 1). A região de DNA amplificada pelos autores (Thomas *et al.*, 2009; Buddenhagen *et al.*, no prelo) foi a trnL/F utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR; Mullis & Faloona, 1987) com os *primers* universais “c” e “f” (Taberlet *et al.*, 1991). *Carex echinochloe* e *C. monostachya* foram utilizadas como grupo

externo, mediante observações das reconstruções filogenéticas disponíveis para a família (Muasya *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009). Os alinhamentos foram editados por Buddenhagen *et al.* (no prelo) nos quais regiões altamente variáveis foram removidas através do software Gblocked (Institut de Biologia Evolutiva – CSIC – UPF, Passeig Marítim de la Barceloneta, Barcelona, Spain). Detalhes dos métodos de PCR e dos alinhamentos podem ser encontrados em Buddenhagen *et al.* (no prelo).

Reconstruções filogenéticas

A partir do alinhamento editado por Buddenhagen *et al.* (no prelo) realizamos uma análise de Máxima Verossimilhança (MV) no programa RaxML 8.0.0 (Stamatakis, 2014) através de uma interface gráfica *front-end* raxmlGUI (Silvestro & Michalak, 2012). Para tal, dez buscas independentes foram conduzidas sob o modelo de substituição nucleotídica GTR com taxas de variações gama entre os sítios (o modelo GTRGAMMA). Para os dados de suporte estatístico na topologia foi empregado um *bootstrap* de 10000 pseudo réplicas, exibindo a árvore de MV com os maiores valores encontrados. Além disso, uma análise de Inferência Bayesiana (IB) foi conduzida no programa MrBayes 3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) executado através do portal CIPRES (Miller, Pfeiffer & Schwartz, 2010). Para tal análise, quatro cadeias de Monte Carlo Markov (MCMCs) e quatro corridas simultâneas e independentes foram executadas para 20.000.000 gerações, utilizando o modelo de substituição GTRGAMMA. Subsequentemente, após as análises de convergências das cadeias de Markov, através do software Tracer 1.6 (Rambaut *et al.*, 2014), 25% (5.000.000) das gerações iniciais de cada corrida foram descartadas como fase de *burn-in*, enquanto que as demais árvores foram utilizadas para a construção de uma árvore consenso com valores de probabilidade posterior (PP) como medida de suporte estatístico dos clados.

Reconstrução de caráter ancestral

Para investigar a evolução de caracteres morfológicos relacionados às síndromes de polinização presentes em *Rhynchospora*, tais como anemofilia e entomofilia, foram mapeadas e analisadas as transições de diversos caracteres florais considerados importantes por Costa *et al.* (em prep., capítulo 1 da tese) para caracterização das síndromes. As características das espécies presentes na filogenia foram observadas e analisadas a partir de espécimes vivos, bem como de exsicatas depositadas no herbário William e Lynda Steere, no New York Botanical Garden, em Nova York, nos Estados Unidos e dados da literatura. No total foram analisados caracteres de 79 espécies da tribo *Rhynchosporae* e de duas espécies do gênero

Carex, utilizados como grupo externo. Para cada espécie foram analisados pelo menos três espécimes, totalizando cerca de 240 indivíduos.

Os caracteres mapeados foram: **tipo de inflorescência**: (1) panícula, (2) capítulo parcial, (3) capítulo único, (4) capítulo parcial ou capítulo único, (5) espiguetas; **cor das brácteas involucrais**: (1) verde, (2) verde e branca; **cor das brácteas florais**: (1) marrom, (2) verde, (3) branca, (4) amarela ou laranja; **cor das anteras**: (1) amarela, (2) branca; **sistema sexual**: (1) unissexual, (2) andromonóico, (3) bissexual; **exposição das anteras e estigma**: (1) presença, (2) ausência; **ramificação do estigma**: (1) pontual, (2) bifido, (3) trifido; e **textura do estigma**: (1) liso, (2) papiloso, (3) plumoso (Figura 1; Anexo – Tabela 2).

As reconstruções dos estados ancestrais de cada caráter das espécies foram traçadas e sobrepostas na árvore filogenética obtida pelo método de Máxima Verossimilhança, através do método de verossimilhança utilizando o programa Mesquite 3.2 (Maddison & Maddison, 2017).

RESULTADOS

Relações filogenéticas

As árvores de consenso geradas por MV e IB apresentaram topologias similares, suportando o monofiletismo da tribo Rhynchosporae (Probabilidade posterior - PP de 1.00; suporte de *bootstrap* (BS) de 100) (Figura 2). O gênero *Pleurostachys* foi inserido dentro do gênero *Rhynchospora*.

A relação entre os quatro principais clados presentes no grupo, os quais foram denominados de A, B, C e D divergiu da topologia encontrada por Buddenhagen *et al.* (no prelo) (Figura 2), não apresentando suporte estatístico nas reconstruções de MV e IB realizadas no presente estudo, onde foram evidenciada a presença de politomias nos nós mais ancestrais (Figura 2). Dentro dos clados, houve suporte significativo na relação entre os terminais (BS entre 81 e 100; PP = 1.0 para os clados B, C e D), com exceção do clado A (BS 41; PP 0.59). Adicionalmente, as relações entre as espécies dentro dos clados foram congruentes com os resultados observados por Buddenhagen *et al.* (no prelo).

Reconstrução de estados de caráter ancestrais

A análise de MV reconstruiu a inflorescência do tipo panícula, característica plesiomórfica no grupo externo, como sendo o mais provável estado ancestral da tribo

Rhynchosporae. Esta análise de reconstrução indica que houve múltiplas mudanças independentes do tipo de inflorescência, surgindo diversas vezes inflorescências dos tipos capítulos parciais, nos clados A e D; capítulos únicos, nos clados A e B; e espiguetas, que surgiu uma única vez e está presente em apenas duas espécies, *R. galeana* e *R. oligantha* (Figura 3).

A reconstrução ancestral da cor das brácteas involucrais indica que verde é a cor plesiomórfica e está presente em representantes de todos os clados. A mudança de estado de caráter para brácteas involucrais verdes com manchas brancas surgiu três vezes de forma independente, uma vez no clado B, em *R. albiceps*, *R. consanguinea* e *R. oaxacana*, e duas vezes em duas espécies no clado C, em *R. nervosa* e *R. floridensis*.

O estado de caráter ancestral da cor das brácteas florais na tribo Rhynchosporae é marrom (Figura 1 – A, F). As brácteas florais brancas surgiram de forma independente nos clados B, C e D. No clado B, as brácteas brancas apareceram nas mesmas espécies em que as brácteas involucrais verdes e brancas surgiram; em C, além de *R. nervosa* e *R. floridensis*, está presente em *R. radicans*, *R. sesleroides*, *R. subsetigera*, e uma autapomorfia de forma independente, em *R. setigera*. No clado D, apenas *R. alba* apresenta esta autapomorfia. Além disso, surgiram de forma independente brácteas esverdeadas em *R. cephalotes*, *R. recurvata* e *R. exaltata* no clado A; e brácteas amarelas ou laranjas em *R. riedeliana*, no clado A e em *R. globosa* e *R. elatior* no clado B (Figura 4). No que diz respeito à reconstrução ancestral da cor das anteras da tribo Rhynchosporae, a cor amarela é indicada como sendo uma característica plesiomórfica, no entanto este caráter mostrou-se pouco informativo, tendo havido diversas mudanças do estado do caráter de forma independente para cor branca em espécies do clado A, B, e C (Figura 5).

A análise de reconstrução do estado ancestral para a ramificação do estigma indica que o ancestral da tribo Rhynchosporae apresenta o estigma ramificado de forma bífida, que se configura como um caráter plesiomórfico no gênero. Esta característica se manteve em todos os clados com exceção do clado B, no qual quase todas as espécies apresentaram mudança do estado, o estigma pontual. Adicionalmente, foram observadas reversões do estado de caráter pontual para o bífido, como em *R. corymbosa*, *R. scutellata* e *R. tracyi*. Já em relação a reconstrução ancestral da textura do estigma, o estigma liso é indicado pela análise como sendo uma característica sinapomórfica no gênero *Rhynchospora*. Já as espécies de *Pleurostachys*, incluídas no clado A, apresentam como autapomorfia o estigma plumoso (Figura 6).

Tanto as anteras quanto o estigma das espécies da tribo Rhynchosporae podem se exteriorizar, sendo uma característica considerada plesiomórfica a partir da análise de reconstrução ancestral. Contudo, cinco espécies, duas do clado C (*R. micrantha*, *R. miliaceae*) e três do clado D (*R. galeana*, *R. champmanii* e *R. brittonii*) apresentaram de forma independente ausência da exteriorização destes verticilos reprodutivos (Figura 7).

Por último, os sistemas sexuais que podem ser encontrados na tribo Rhynchosporae são o bissexual e andromonoico. A análise reconstruiu o sistema bissexual como a característica plesiomórfica na tribo, havendo mudança para o sistema sexual andromonóico em todos os quatro clados, havendo, contudo, maior quantidade de espécies com este sistema nos clados A e B, nos quais todas as espécies apresentaram andromonoicismo (Figura 8).

DISCUSSÃO

Os atributos florais relacionados à anemofilia, tais como inflorescência do tipo panícula, partes florais mais inconspícuas, tais como brácteas involucrais verdes, brácteas florais marrons, estigma bífido, papiloso foram considerados plesiomórficos na tribo Rhynchosporae, como esperado. Características que podem atrair insetos e promovem a polinização por estes vetores de pólen surgiram de forma independente nos clados, sendo possível encontrar espécies ambófilas e entomófilas, como verificado por Costa *et al.* (em prep., capítulo 1 da tese) distribuídas ao longo da topologia da árvore filogenética. No clado A, os autores (Costa *et al.*, em prep., capítulo 1 da tese) observaram ambofilia em *R. cephalotes*; no clado B; ambofilia e/ou entomofilia em *R. albiceps*, *R. consanguinea*, *R. globosa* e *R. elatior*; ambofilia no clado C, em *R. setigera*;; e ambofilia no clado D, em *R. alba*. Já no presente estudo, foi possível identificar adaptações á entomofilia em todas as espécies de um subclado (BS = 100, PP =1) do clado B, incluindo, além das espécies estudadas por Costa *et al.* (em prep.; capítulo 1 desta tese), *R. oaxacana* e *R. rubra*; no clado C, em *R. radicans*, *R. nervosa*, *R. floridensis* e *R. subsetigera*. Dentre os clados analisados, um subclado presente no clado B, apresentou maior número de espécies com atributos entomófilos, tais como capítulo único, espécies com brácteas florais e/ou involucrais e/ou anteras brancas, emissão de odor (Costa *et al.*, em prep.; capítulo 1 desta tese), sendo também o clado B, o único clado com espécies apresentando estigma pontual.

Sobre tais atributos florais presentes na tribo Rhynchosporae, o tipo de inflorescência panícula é um tipo de inflorescência mais difusa, quando comparado a inflorescência do tipo capítulo e tem sido associado à polinização pelo vento (Niklas, 1987; Friedman & Harder,

2004). Segundo Friedman & Harder (2004), inflorescências mais difusas permitem uma melhor interação entre as flores e as correntes de ar, que podem de forma eficaz, carregar os grãos de pólen de uma inflorescência até o estigma de outra inflorescência da mesma espécie. Por sua vez, as inflorescências do tipo capítulo diminuem o fluxo de pólen no ar para entrar em contato com o estigma (Niklas, 1987). Além disso, nesse tipo de inflorescência o recurso floral está concentrado no topo do escapo e, desta forma, sugerimos que este tipo floral possa ser mais atrativo aos insetos polinizadores por também diminuir o tempo de forrageio.

A evolução múltipla de brácteas involucrais e florais corrobora com os dados de Thomas (1984) e Buddenhagen *et al.* (no prelo). Embora Buddenhagen *et al.* (no prelo), mencionem que inflorescências conspícuas surgiram em todos os clados de Rhynchosporae, neste estudo registramos o surgimento destes caracteres em três clados (B, C e D). Neste sentido, espécies com brácteas involucrais ou brácteas florais e/ou anteras brancas tem sido consideradas ambófilas ou entomófilas (Leppik, 1955; Thomas, 1984; Costa & Machado, 2012; Costa *et al.*, em prep.; capítulo 1 da tese).

A cor amarela das anteras e do pólen, plesiomórfica na tribo Rhynchosporae, não é uma característica que tem sido associada à anemofilia. A coloração amarela do pólen é um atributo plesiomórfico nas fanerógamas, independente do sistema de polinização (Lunau, 2000). Esta cor tem sido associada à propensão do pólen por absorver luz ultra-violeta e reflete comprimentos de onda que podem causar aquecimento, tendo origem nos pigmentos flavonoides presentes na parede do pólen (Harborne & Grayer, 1993; Lunau, 1999). Já as anteras brancas são atributos presentes em *Rhynchospora* (Costa & Machado, 2012; Costa *et al.*, em prep.; capítulo 1 da tese), surgiram de forma independente ao longo da topologia da reconstrução (Figura 5). Desta forma, mesmo não sendo informativo há registros deste caráter como adaptação para entomofilia que pode juntamente com outros atributos florais garantir a atração de polinizadores (Magalhães *et al.*, 2005; Costa & Machado, 2012).

A ramificação do estigma presente na tribo Rhynchosporae como caráter plesiomórfico reforça a ideia da importância deste atributo para a anemofilia. O estigma ramificado aumenta a área de superfície dessa estrutura (Endress, 1994), favorecendo maior eficiência na captura de pólen no ar. A mudança para estigma pontual no clado B indica que nestas espécies pode haver uma menor eficiência de capturar grãos de pólen no ar, o que poderia, conseqüentemente, diminuir a participação deste vetor de pólen na formação de frutos destas espécies. Neste clado, espécies como *R. albiceps*, *R. barbata* e *R. elatior* apresentam formação de frutos tanto pelo vento quanto por insetos, contudo, *R. consanguínea*

é uma espécie que pode ser considerada totalmente entomófila em participação significativa do vento para seu sucesso reprodutivo (Costa *et al.*, em prep. capítulo 1 da tese).

O estigma liso foi uma característica presente em todas as espécies de *Rhynchospora* e papiloso em *Pleurostachys* (Figura 6). Este atributo juntamente com a ramificação do estigma pode ser considerado um caráter de valor taxonômico significativo dentro desta tribo. Na reconstrução deste caráter observou-se uma perda de área superficial do estigma na tribo (Figura 6), sendo plumoso no grupo externo.

A exteriorização das anteras presente na maioria das espécies da tribo *Rhynchosporae* tem sido considerada uma característica de plantas anemófilas que facilita a ação do vento para levar os grãos de pólen no ar e a exposição do estigma uma adaptação que permite e otimiza a captura dos grãos no ar (Niklas, 1987; Endress, 1994; Ackerman, 2000; Friedman & Harder, 2004). Contudo, estes atributos se mantiveram na maioria das espécies, mesmo naquelas que são totalmente polinizadas por insetos, como *Rhynchospora consanguinea* (Clado B). As anteras e os estigmas expostos também permitem que insetos tenham acesso ao recurso floral e que o estigma entre em contato com o corpo dos insetos polinizadores (Costa & Machado, 2012). A ausência de exteriorização destes verticilos reprodutivos foi uma autapomorfia indicada pela reconstrução deste caráter e está presente em *R. micrantha*, *R. miliaceae* (Clado C), em *R. galeana*, *R. brittonii* e em *R. globularis* (Clado D). Estes eventos independentes que surgiram nas diferentes linhagens pode estar relacionado a uma possível convergência adaptativa, em outro sistema de polinização alternativo ao vento e insetos, a cleistogamia. Como evidência desta sugestão todas estas espécies apresentam redução do número de anteras comumente encontradas em *Rhynchospora*, que são três, podendo estar presentes apenas 1 ou 2 anteras, além de possuírem baixa razão pólen óvulo (Razão P/O: *R. micrantha*: 120.33 ± 98.2 ; *R. miliaceae*: 265 ± 104.3 ; *R. galeana*: 149 ± 36.2 ; *R. globularis* 1086.66 ± 327.1 ; *R. brittonii*: 241 ± 23.3) (observações pessoais).

Dentre as teorias para o surgimento do andromonoicismo nas Angiospermas está a hipótese de realocação de recurso, no qual a produção de flores estaminadas na inflorescência (no caso, espiguetas), são menos custosas energeticamente, realocando esta energia para outras características que possam aumentar o *fitness* da planta (Solomon, 1986; Spalik, 1991; Emms, 1993). Além disso, as flores estaminadas poderiam aumentar a atratividade da inflorescência para os polinizadores (Solomon, 1986; Spalik, 1991; Emms, 1993). De fato, a maioria das espécies que apresentaram este tipo de sistema sexual foram aquelas que possuem atributos secundários, atrativos para os insetos polinizadores, presentes principalmente nos clados A e B (Figura 8).

Portanto, este estudo na tribo Rhynchosporae permitiu fornecer uma explicação mais ampla sobre a evolução de diversos atributos florais e reprodutivos considerados chave na ecologia da polinização nas espécies da tribo. Desta forma, foi possível entender como os caracteres relacionados à entomofilia surgiram múltiplas vezes de forma independente nos clados e como especificamente em uma linhagem (Clado B) observou-se mudanças de um conjunto de caracteres adaptativos derivados relacionados a entomofilia. Este conjunto de dados confirma a importância de identificar e mapear caracteres morfológicos e ecológicos que permitam o entendimento de mudanças de sistema de polinização e seus efeitos históricos na evolução dos grupos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de doutorado (IBPG-0452-2.05/10) de ACGC; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (Edital Universal 459485/2014-8) e pela bolsa de produtividade de ICM; ao National Science Foundation (DEB-0946618) pela assistência de campo de WWT.

LITERATURA CITADA

- Ackerman JD. 2000. Abiotic and pollen and pollination: ecological, functional, and evolutionary perspectives. *Plant Systematic and Evolution* 222: 167-185.
- Alves M, Araújo AC, Prata AP, Vitta F, Heflers S, Trevisan R, Gil ASB, Martins S, Thomas WW. 2009. Diversity of Cyperaceae in Brazil. *Rodriguésia* 60: 771–782.
- Barrett SCH. 2013. The evolution of plant reproductive systems: how often are transitions irreversible? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 09-13.
- Buddenhagen CE, Thomas WW, Mast AR. (no prelo). A First Look at Diversification of Beaksedges (Tribe Rhynchosporae: Cyperaceae) in Habitat, Pollination, and Photosynthetic Features. *Memoirs New York Botanical Garden*.
- Costa ACG, Machado IC. 2012. Flowering dynamics and pollination system of the sedge *Rhynchospora ciliata* (Vahl) Kük. (Cyperaceae): does ambophily enhance its reproductive success? *Plant Biology* 14: 881-887.
- Cruden RW. 2000. Pollen grains: why so many? *Plant Systematics and Evolution* 222: 143-165.

- Culley TM, Weller SG, Sakai AK. 2002. The evolution of wind pollination in angiosperms. *Ecology & Evolution* 17: 361-369
- Emms SK. 1993. Andromonoecy in *Zigadenus paniculatus* (Liliaceae): spatial and temporal patterns of sex allocation. *American Journal of Botany* 80: 914–923.
- Endress PK. 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Faegri K, Pijl L. 1979. *The principles of pollination ecology*. 3 ed. Oxford: Pergamon Press.
- Friedman J, Harder LD. 2004. Inflorescence architecture and wind pollination in six grass species. *Functional Ecology* 18: 851-860.
- Givnish TJ, Ames M, McNeal JR, McKain MR, Steele PR, Pamphilis CW, Sean W, Graham SW, Pires JC, Stevenson DW, Wendy B, Zomlefer WB, Briggs BG, Duvall MR, Moore MJ, Heaney JM, Soltis DE, Soltis PS, Thiele K, Leebens-Mack JH. 2010. Assembling the tree of the Monocotyledons: plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 97: 584-616.
- Guaglianone ER. 2001. Contribución al estudio Del género *Rhynchospora* (Cyperaceae) v. sección longirostres en América austral. *Darwiniana* 39: 287–342.
- Harborne JB, Grayer RJ. 1993. Flavonoids and insects. In: Harborne JB, ed. *The Flavonoids: Advances in research since 1986*. Chapman & Hall, London, pp. 589–618.
- Leppik EE. 1955. *Dichronema ciliata*, a noteworthy entomophilous plant among Cyperaceae. *American Journal of Botany* 42: 455–458.
- Linder HP. 1998. Morphology and the evolution of wind pollination. In: Owens SJ, Rudall PJ, eds. *Reproductive Biology in Systematics, Conservation and Economic Botany*. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Luceño M, Alves MV, Mendes AP. 1997. Catálogo florístico y claves de identificación de las ciperáceas de los estados de Paraíba y Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 55: 67–100.
- Lucero LE, Vegetti AC. 2012 Inflorescence structure in *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). *Flora* 207:47–56.
- Lucero LE, Abelardo C, Vegetti AC, Reinheimer R. 2014. Evolution and Development of the Spikelet and Flower of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *International Journal of Plant Sciences* 175: 186-201.
- Lunau K. 2000. The ecology and evolution of visual pollen signals. pp.89-111. In: Dafni A, Hese M, Pacini E. eds. *Pollen and pollination*. Viena: Springer-Verlag.

- Maddison WP, Maddison DR. 2017. *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Version 3.2. Disponível em: <<http://mesquiteproject.org>>.
- Magalhães AF, Ruiz ALTG, Flach A, Faria AD, Magalhães EG, Amaral MCE. 2005. Floral scent of *Eleocharis elegans* (Kunth) Roem. & Schult. (Cyperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 675-679.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. 2010. *Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees*. Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA, 1–8.
- Muasya, AM, Simpson DA, Verboom GA, Goetghebeur P, Naczi RFC, Chase, MW, Smets E. 2009. Phylogeny of Cyperaceae Based on DNA Sequence Data: Current Progress and Future Prospects . *The Botanical Rev* 75:2–21.
- Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase- catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335.
- Niklas KJ. 1987. Pollen capture and wind-induced movement of compact and diffuse grass panicles: implications for pollination efficiency. *American Journal of Botany* 74: 74–89.
- Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ. 2014. Tracer v1.6. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Silvestro D, Michalak I. 2012. RaxmlGUI: A graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution* 12: 335-337.
- Solomon BP. 1986. Sexual allocation and andromonoecy resource investment in male and hermaphrodite flowers of *Solanum carolinense*, Solanaceae. *American Journal of Botany* 73: 1215-1221.
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-3
- Spalik K. 1991. On evolution of andromonoecy and ‘overproduction’ of flowers: a resource allocation model. *Biological Journal of the Linnean Society* 42: 325–336
- Strong MT. 2006. Taxonomy and distribution of *Rhynchospora* (Cyperaceae) in the Guianas, South America. *Contributions from the United States National Herbarium* 53: 1–225.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non- coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Thomas WW. 1984. The systematics of *Rhynchospora* section *Dichromena*. *Memoirs New York Botanical Garden* 37: 1–116.

- Thomas, WW, Araujo AC, Alves MV. 2009. A preliminary molecular phylogeny of the Rhynchosporae (Cyperaceae). *The Botanical Review* 75: 22–29.
- Whitehead DR. 1969. Wind pollination in the Angiosperms: evolutionary and environmental considerations. *Evolution* 23: 28–35.
- Wolowski M, Freitas L. 2015. An overview on pollination of the Neotropical Poales. *Rodriguésia* 66: 329–336.
- Wragg PD, Johnson SD. 2011. Transition from wind pollination to insect pollination in sedges: experimental evidence and functional traits. *New Phytologist* 191: 1128–1140.

FIGURAS

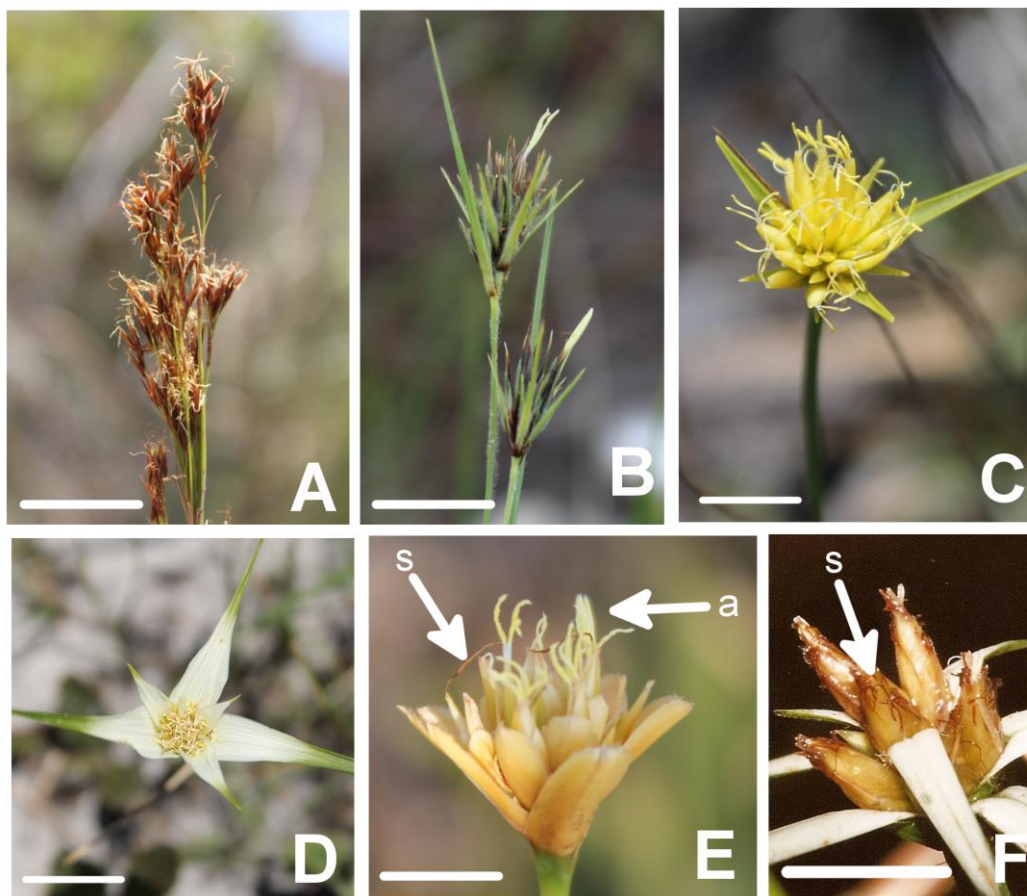


Figura 1. Espécies do gênero *Rhynchospora* apresentando variados atributos florais relacionados á anemofilia e entomofilia, tais como inflorescência do tipo panícula (A), capítulo parcial (B), capítulo único (C), brácteas involucrais verdes (C), brácteas involucrais verde e branca (D e F), brácteas florais marrons (A e F), brácteas florais esverdeadas (B), brácteas florais amarelo e laranja (C e E), exposição das anteras e estigmas, que estão indicados nas setas (a-anteras, s-estigmas) (E e F), sendo possível distinguir estigma pontual em E e estigma bífido em F. (A- *Rhynchospora dissitispicula*, B- *Rhynchospora* sp., C- *Rhynchospora elatior*, D- *Rhynchospora consanguinea*, E- *Rhynchospora globosa*, F- *Rhynchospora ciliata*).

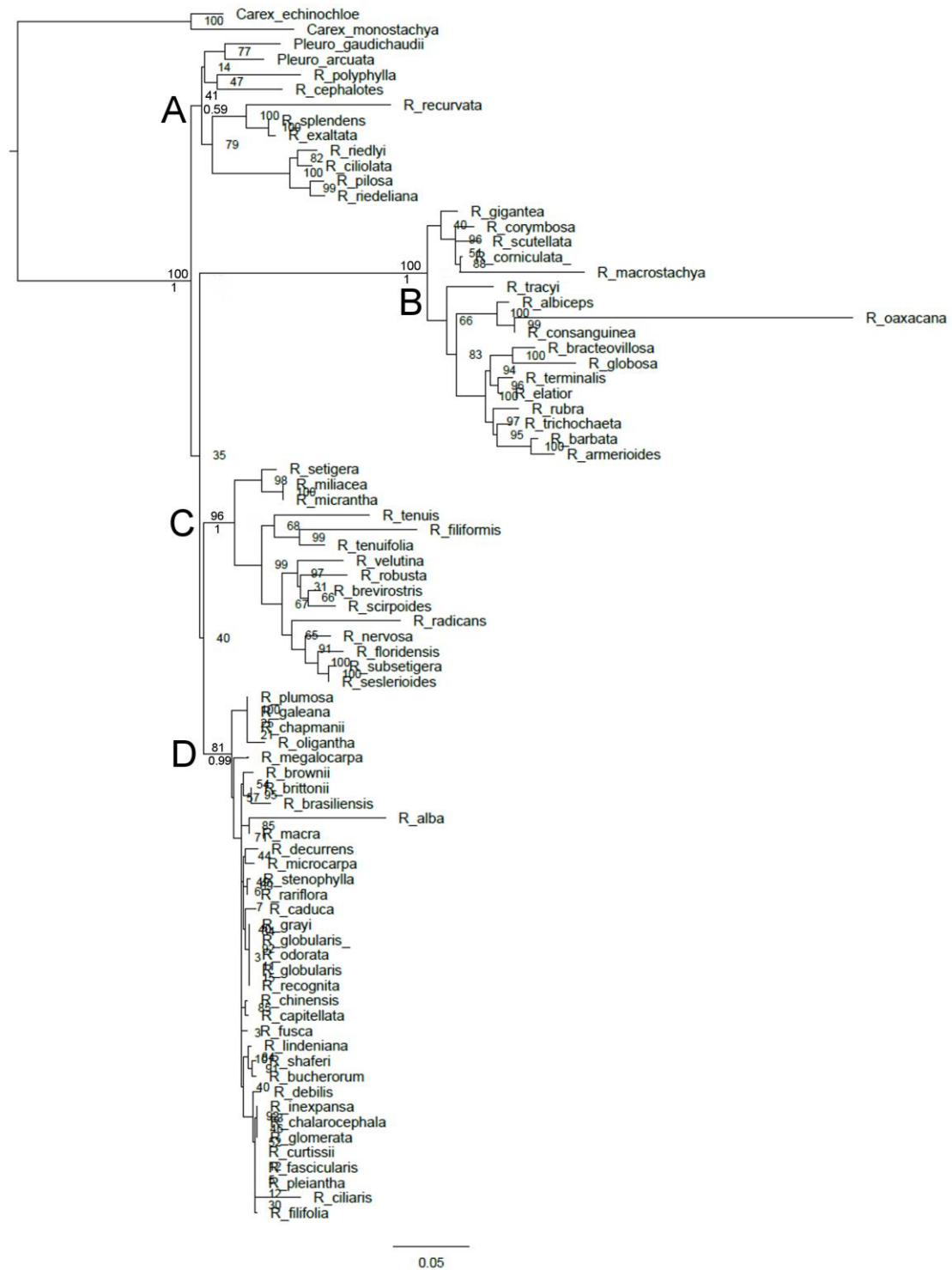


Figura 2. Árvore filogenética da tribo Rhynchosporae gerada a partir sequencias trnL/F através de análise de Máxima Verossimilhança, sendo possível distinguir quatro principais clados, denominados de A, B, C e D (valores acima dos ramos são de *Bootsrap*, e abaixo são de Probabilidade Posterior).

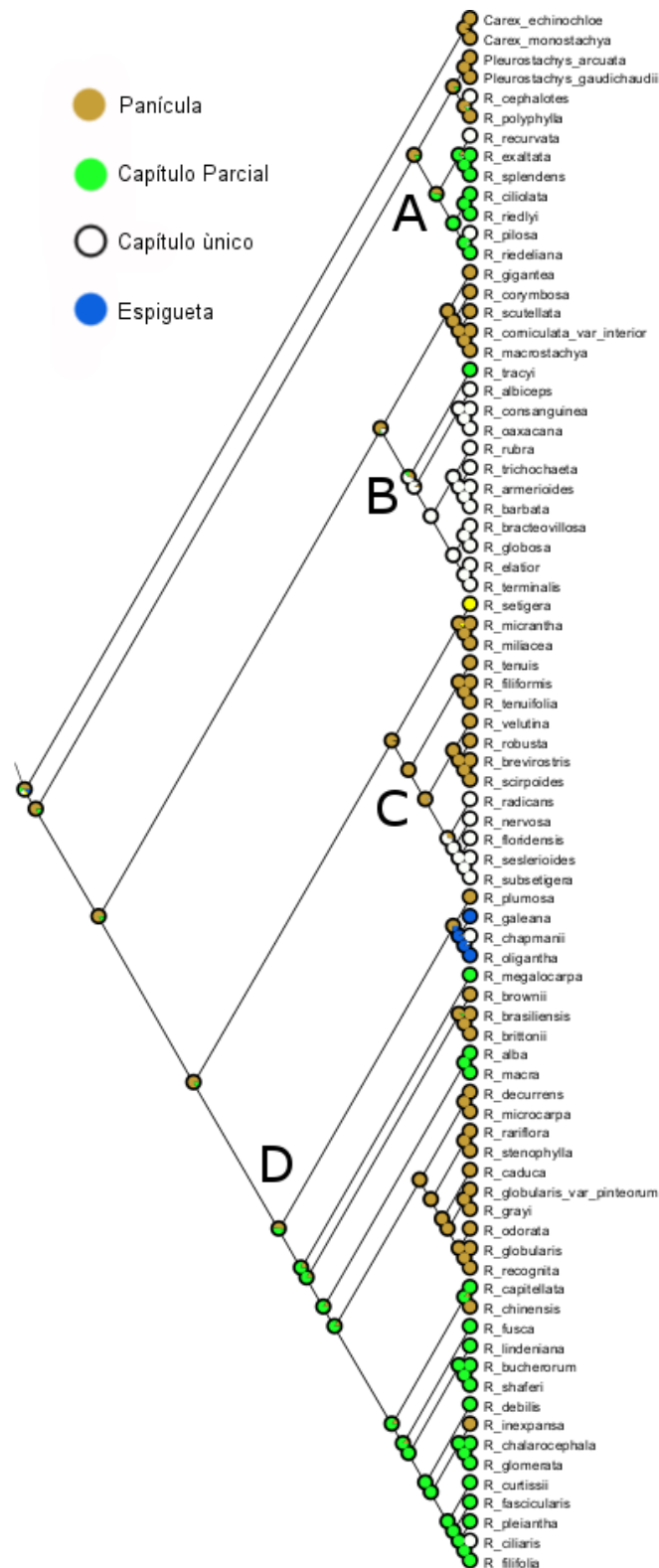


Figura 3. Reconstrução ancestral do tipo de inflorescência na tribo Rhynchosporae a partir de análise de Máxima Verossimilhança. Os diagramas em forma de pizza indicam em cada nó a probabilidade ancestral do tipo de inflorescência.

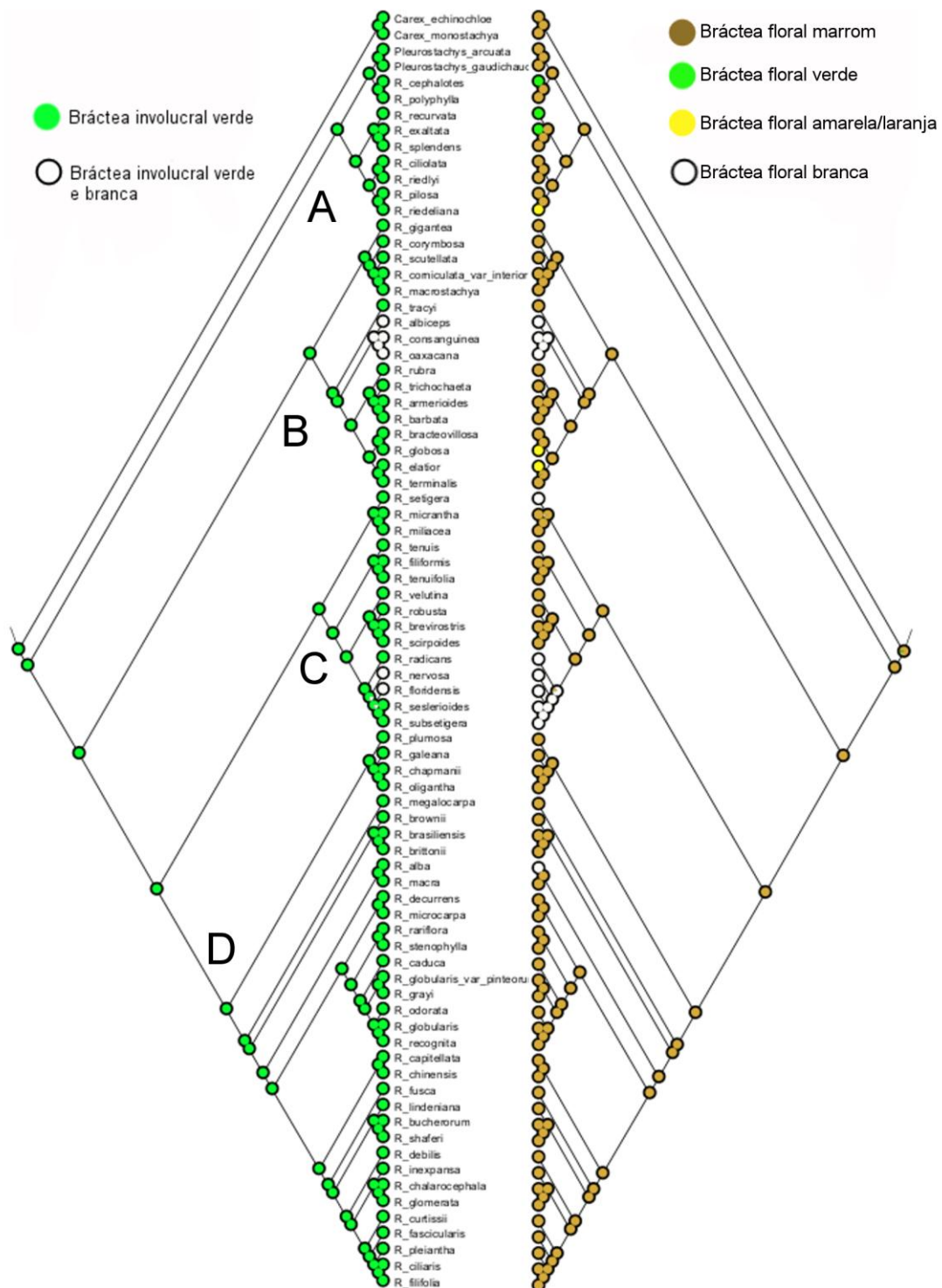


Figura 4. Reconstrução ancestral de cores de brácteas involucrais e florais na tribo Rhynchosporae a partir de análise de Máxima Verossimilhança. Os diagramas em forma de pizza indicam em cada nó a probabilidade ancestral das cores das brácteas.

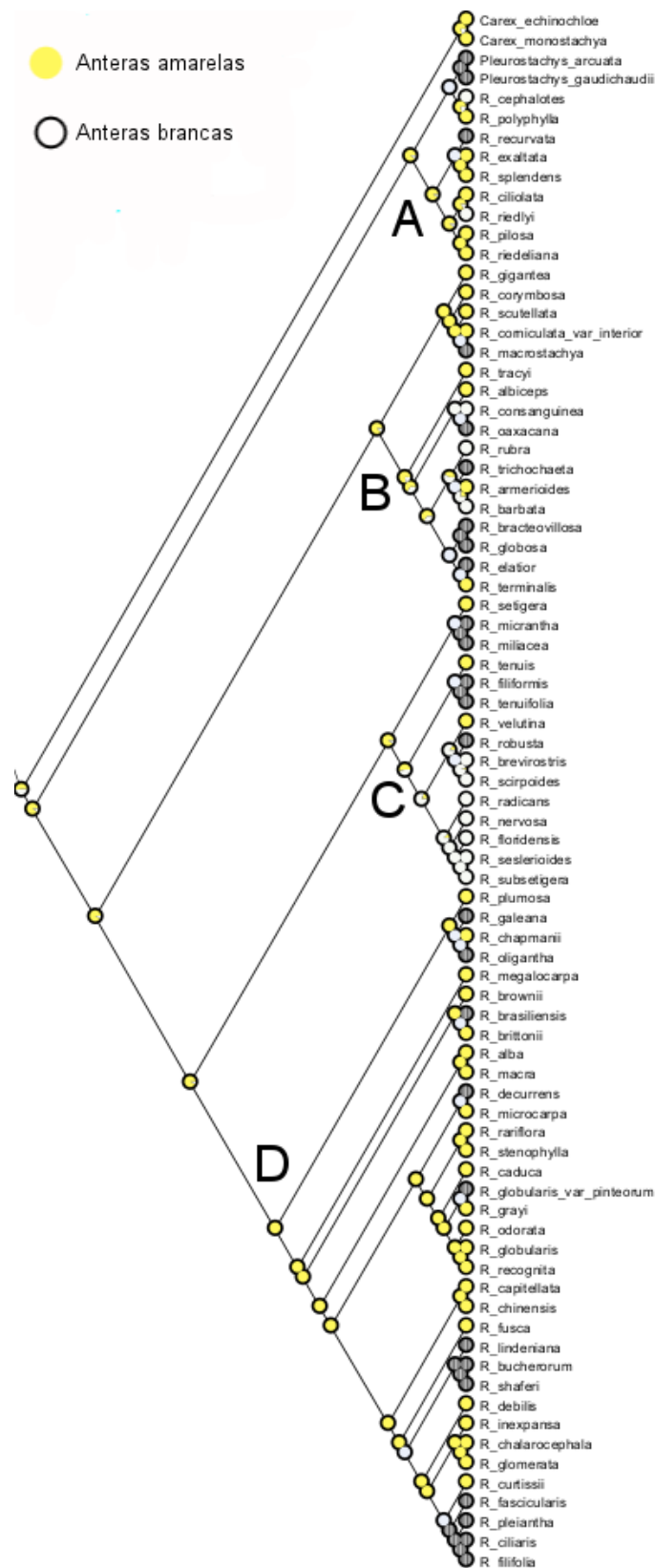


Figura 5. Reconstrução ancestral de cores de anteras na tribo Rhynchosporae a partir de análise de Máxima Verossimilhança. Os diagramas em forma de pizza indicam em cada nó a probabilidade ancestral das cores das anteras.

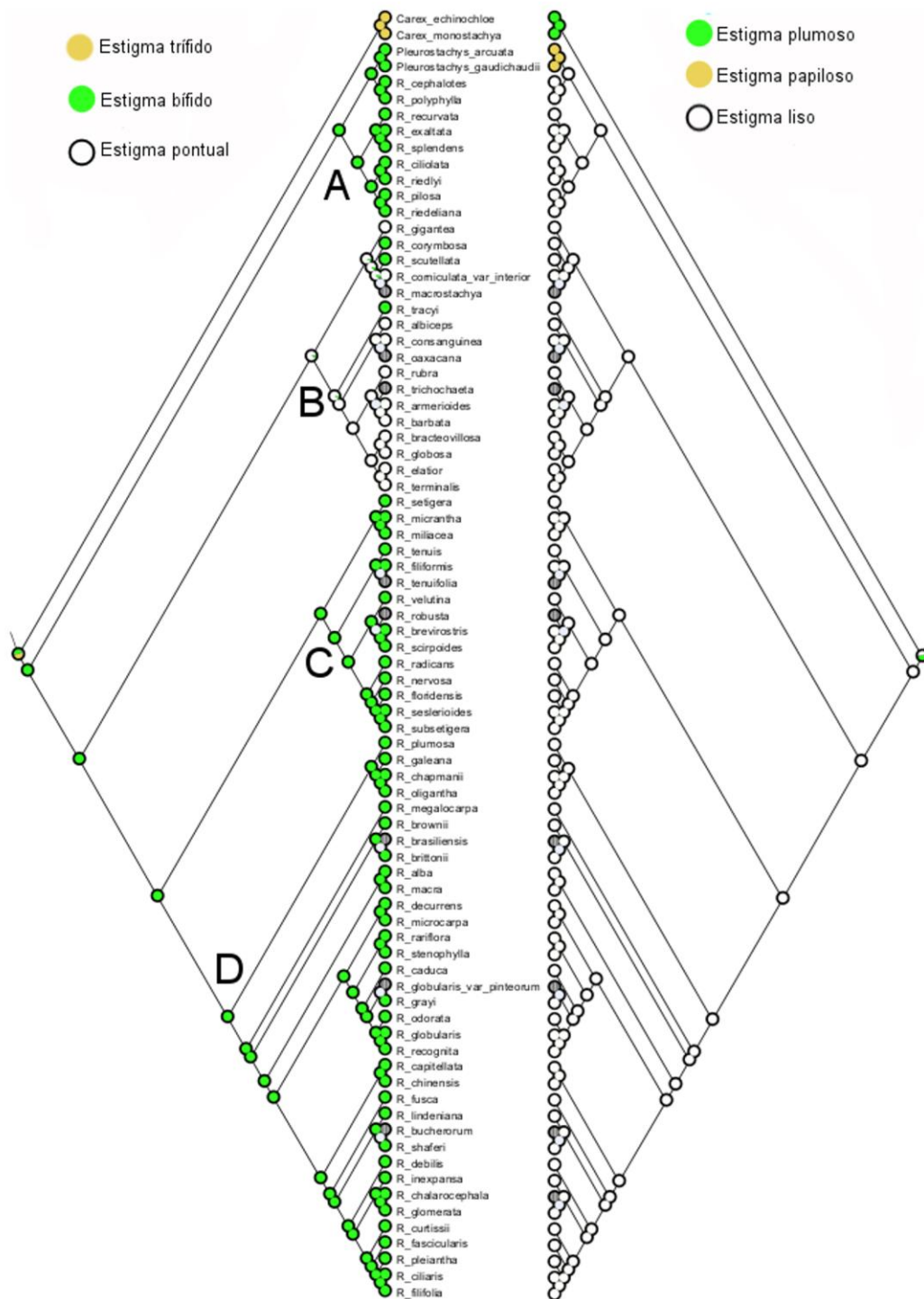


Figura 6. Reconstrução ancestral da ramificação e textura do estigma de representantes da tribo Rhynchosporae a partir de análise de Máxima Verossimilhança. Os diagramas em forma de pizza indicam em cada nó a probabilidade ancestral dos tipos de ramificação e textura dos estigmas.

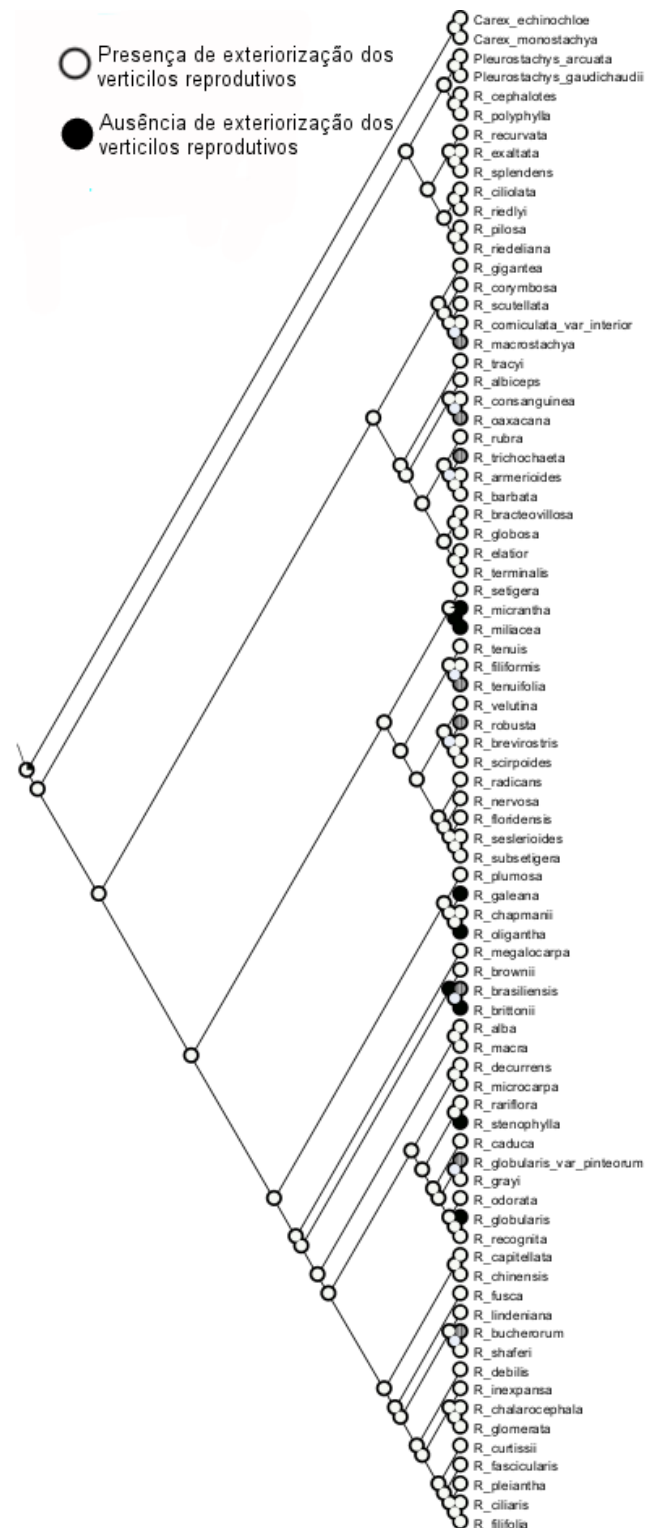


Figura 7. Reconstrução ancestral da presença / ausência de exteriorização das anteras e estigmas de representantes da tribo Rhynchosporae a partir de análise de Máxima Verossimilhança. Os diagramas em forma de pizza indicam em cada nó a probabilidade ancestral de exteriorização das anteras.

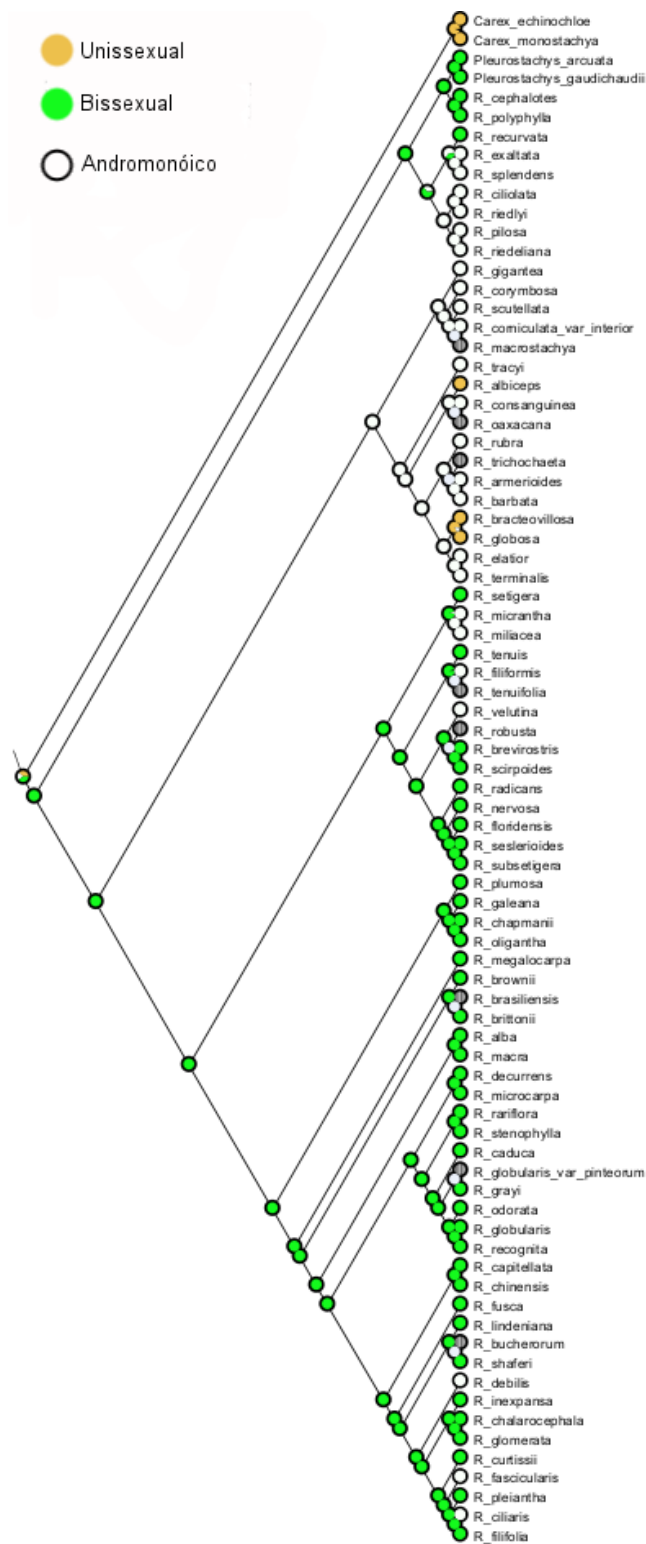


Figura 8. Reconstrução ancestral do sistema sexual presente na tribo Rhynchosporeae a partir de análise de Máxima Verossimilhança. Os diagramas em forma de pizza indicam em cada nó a probabilidade ancestral do sistema sexual.

ANEXOS

Tabela 1. Tabela adaptada de Buddenhagen *et al.* (no prelo) com dados dos exemplares das espécies depositados em herbário e acessos genéticos usados neste estudo.

<i>Espécie</i>	Collector and number	Herbarium or Genbank ID
<i>Carex echinochloe</i>	M. Muasya 1051	AF191818
<i>C. monostachya</i>	M. Muasya 1052	EU28849
<i>Pleurostachys arcuata</i>	W. Thomas 14242	NY
<i>P. gaudichaudii</i>	W. Thomas 14245	NY
<i>Rhynchospora alba</i>	D.A. Simpson 2671	AY344174
<i>R. albiceps</i>	W. Thomas 14449	NY
<i>R. armerioides*</i>	M.J. Jansen Jacobs 5031	NY
<i>R. barbata</i>	M. Alves 2197	NY
<i>R. bracteovillosa</i>	A.C. Araujo 896	INC
<i>R. brasiliensis</i>	S. Diesel s n	NY
<i>R. brevirostris</i>	W. Anderson 8031	NY
<i>R. brittonii</i>	L. Lucero 63	KC111772
<i>R. brownie</i>	K.L. Wilson 9909	AY230043
<i>R. bucherorum</i>	W. Thomas 14933	NY
<i>R. caduca</i>	C. Buddenhagen 201107141	FSU
<i>R. capitellata</i>	L.C. Anderson 24967	FSU
<i>R. cephalotes</i>	R. Naczi 11691	NY
<i>R. chalarocephala</i>	L.C. Anderson 25684	FSU
<i>R. chapmanii</i>	W. Thomas 12150	NY
<i>R. chinensis</i>	J. Junung 1010313	JX644724
<i>R. ciliaris</i>	W. Thomas 12146	NY
<i>R. ciliolata</i>	W. Thomas 14478	NY
<i>R. consanguinea</i>	S. Martins 341	KC111770
<i>R. corniculata var interior</i>	E. Roalson 1215	AF285068
<i>R. corymbosa</i>	K.L. Clarke 75	AY230044

<i>R. curtissii</i>	L.C. Anderson 22231	FSU
<i>R. debilis</i>	L.C. Anderson 25625	FSU
<i>R. decurrens</i>	L.C. Anderson 23273	FSU
<i>R. elatior</i>	V.C. Souza 14455	NY
<i>R. exaltata</i>	W. Thomas 12269	NY
<i>R. fascicularis</i>	W. Thomas 14714	NY
<i>R. fi lifolia</i>	R.K. Godfrey 63027	FSU
<i>R. fi liformis</i>	W. Thomas 142708	NY
<i>R. fl oridensis</i>	R.K. Godfrey 73174	FSU
<i>R. fusca</i>	R. Naczi 12035	NY
<i>R. galeana</i>	L.C. Anderson 17956	FSU
<i>R. gigantea</i>	T. Angel 1895	NY
<i>R. globosa</i>	A.C. Araujo 721	ICN
<i>R. globularis</i>	R. Kral 81734	FSU
<i>R. globularis</i> var. <i>pinetorum</i>	R.K. Godfrey 63791	FSU
<i>R. glomerata</i>	L.C. Anderson 25062	FSU
<i>R. grayi</i>	L.C. Anderson 24462	FSU
<i>R. inexpansa</i>	W. Thomas 14706	NY
<i>R. lindeniana</i>	P. Delprete 8692	NY
<i>R. macra</i>	W. Thomas 14709	NY
<i>R. macrostachya</i>	W. Thomas 12144	NY
<i>R. megalocarpa</i>	M. Strong 2698	NY
<i>R. microcarpa</i>	C. Buddenhagen 1070810	FSU
<i>R. miliacea</i>	W. Thomas 14930	NY
<i>R. nervosa</i>	W. Thomas 14014	NY
<i>R. oaxacana</i>	Sem registo	AJ489385
<i>R. odorata</i>	L.C. Anderson 12129	FSU
<i>R. oligantha</i>	L.C. Anderson 19535	FSU
<i>R. splendens</i>	M. Alves 1626	NY
<i>R. stenophylla</i>	L.C. Anderson 24657	FSU

<i>R. subsetigera</i>	P. Delprete 8649	NY
<i>R. tenuifolia</i>	P. Delprete 8869	NY
<i>R. tenuis</i>	L. Lucero 20	KC111774
<i>R. terminalis</i>	S. Martin	KC111771
<i>R. tracyi</i>	L.C. Anderson 22297	FSU
<i>R. trichochaeta</i>	T. Plowman 8622	NY
<i>R. velutina</i>	M. Arbo 6647	NY

Tabela 2. Caracteres morfológicos e estados de caráter usados para reconstrução ancestral na tribo Rhynchosporae. Tipo de inflorescência (TI): 0 panícula, 1 capítulo parcial, 2 capítulo total, 3 capítulo parcial ou total, 4 espiguetas; Cor brácteas involucrais (BI): 0 verde, 1 branco e verde; cor das brácteas florais (BF): 0 marrom, 1 branco, 2 amarelo, 3 verde; cor das antera (CA): 0 amarelo, 1 branco; ramificação do estigma (RE): 0 pontual, 1 bifido, 2 trifido; textura do estigma (TE): 0 liso, 1 papiloso, 2 plumoso; exteriorização das anteras e estigmas (EAE): 0 ausência, 1 presença; sistema sexual (SS): 0 unissexual, 1 andromonóico, 2 bissexual.

Espécie	TI	BI	BF	CA	RE	TE	EAE	SS
<i>Carex echinochloe</i>	0	0	0	0	2	1	1	0
<i>C. monostachya</i>	0	0	0	0	2	1	1	0
<i>Pleurostachys arcuata</i>	0	0	0	1	1	2	1	2
<i>P. gaudichaudii</i>	0	0	0	1	1	2	1	2
<i>Rhynchospora alba</i>	1	0	1	0	1	0	1	2
<i>R. albiceps</i>	2	1	1	0	0	0	1	0
<i>R. armerioides</i>	2	0	0	0	0	0	1	1
<i>R. barbata</i>	2	0	0	1	0	0	1	1
<i>R. bracteovillosa</i>	2	0	0	1	0	0	1	0
<i>R. brasiliensis</i>	0	0	0	-	-	-	-	-
<i>R. brevirostris</i>	0	0	0	1	1	0	1	2
<i>R. brittonii</i>	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>R. brownii</i>	0	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. bucherorum</i>	1	0	0	-	-	-	-	
<i>R. caduca</i>	0	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. capitellata</i>	1	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. cephalotes</i>	2	0	3	1	1	0	1	2
<i>R. chalarocephala</i>	1	0	0	0	1	-	1	2
<i>R. chapmanii</i>	2	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. chinensis</i>	0	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. ciliaris</i>	2	0	0	-	1	0	1	1
<i>R. ciliolata</i>	1	0	0	0	1	0	1	1
<i>R. consanguinea</i>	2	1	1	1	0	0	1	1
<i>R. corniculata</i>	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>R. corymbosa</i>	0	0	0	0	1	0	1	1
<i>R. curtissii</i>	1	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. debilis</i>	1	0	0	0	1	0	1	1
<i>R. decurrens</i>	0	0	0	-	1	0	1	2
<i>R. elatior</i>	2	0	2	-	0	0	1	1
<i>R. exaltata</i>	1	0	0	0	1	0	1	1
<i>R. fascicularis</i>	1	0	0	-	1	0	1	1
<i>R. filifolia</i>	1	0	0	-	1	0	1	2
<i>R. filiformis</i>	0	0	0	-	1	0	1	1
<i>R. floridensis</i>	2	1	1	1	1	0	1	2
<i>R. fusca</i>	1	0	0	0	1	0	1	2

<i>R. galeana</i>	4	0	0	-	1	0	0	2
<i>R. gigantea</i>	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>R. globosa</i>	2	0	2	-	0	0	1	0
<i>R. globularis</i>	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>R. globularis 2</i>	0	0	0	-	-	-	-	-
<i>R. glomerata</i>	1	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. grayi</i>	0	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. inexpansa</i>	0	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. lindeniana</i>	1	0	0	-	1	0	1	2
<i>R. macra</i>	1	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. macrostachya</i>	0	0	0	-	-	-	-	-
<i>R. megalocarpa</i>	1	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. micrantha</i>	0	0	0	-	1	0	0	1
<i>R. microcarpa</i>	0	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. miliaceae</i>	0	0	0	-	1	0	0	1
<i>R. nervosa</i>	2	1	1	1	1	0	1	2
<i>R. oaxacana</i>	2	1	1	-	-	-	-	-
<i>R. odorata</i>	0	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. oligantha</i>	4	0	0	-	1	0	0	2
<i>R. pilosa</i>	2	0	0	0	1	0	1	1
<i>R. pleiantha</i>	1	0	0	-	1	0	1	2
<i>R. plumosa</i>	0	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. polyphylla</i>	0	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. radicans</i>	2	0	1	1	1	0	1	2
<i>R. rariflora</i>	0	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. recognita</i>	0	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. recurvata</i>	2	0	4	-	1	0	1	2
<i>R. riedeliana</i>	1	0	3	0	1	0	1	1
<i>R. riedlyi</i>	1	0	0	1	1	0	1	1
<i>R. robusta</i>	0	0	0	-	-	-	-	-
<i>R. rubra</i>	2	0	0	1	0	0	1	1
<i>R. scirpoides</i>	0	0	0	1	1	0	1	2
<i>R. scutellata</i>	0	0	0	0	1	0	1	1
<i>R. seslerioides</i>	2	0	1	1	1	0	1	2
<i>R. setigera</i>	3	0	1	0	1	0	1	2
<i>R. shaferi</i>	1	0	0	-	1	0	1	2
<i>R. splendens</i>	1	0	0	0	1	0	1	1
<i>R. stenophylla</i>	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>R. subsetigera</i>	2	0	1	1	1	0	1	2
<i>R. tenuifolia</i>	0	0	0	-	-	-	-	-
<i>R. tenuis</i>	0	0	0	0	1	0	1	2
<i>R. terminalis</i>	2	0	0	0	0	0	1	1
<i>R. tracyi</i>	1	0	0	0	1	0	1	1
<i>R. trichochaeta</i>	2	0	0	-	-	-	-	-
<i>R. velutina</i>	0	0	0	0	1	0	1	1

8 CONCLUSÕES

Nesta tese, classificamos as espécies de *Rhynchospora* em diferentes síndromes de polinização a partir dos atributos florais, que formam um gradiente transicional anemófilas > ambófilas > entomófilas. Esta classificação pode servir como base para classificação de outras espécies pertencentes a diversos gêneros e famílias essencialmente anemófilos em diferentes síndromes de polinização, envolvendo, em diferentes gradações, a participação de vetores bióticos. Dentre os atributos florais presentes em *Rhynchospora*, concluímos que as brácteas involucrais verdes com mancha branca podem aumentar a atratividade, sendo uma característica que contribui para o aumento do sucesso reprodutivo e manutenção da ambofilia. Além disso, populações de espécies com brácteas verdes podem se beneficiar quando ocorrem próximas à espécies com brácteas brancas devido à atração de insetos polinizadores. Além disso, chegamos a conclusão de que a ambofilia pode ser um estágio estável em *Rhynchospora* devido a contribuição dos vetores de pólen, vento e insetos, para a formação de frutos poder variar ao longo do tempo e de acordo com a posição dos indivíduos em um fragmento florestal. Desta forma, a presença de caracteres que permitem a polinização por ambos os vetores de pólen é ser vantajosa e permite a formação de frutos sob diferentes condições ambientais, de forma temporal ou espacial. Nesta tese também esclarecemos sobre a evolução dos diversos atributos florais e reprodutivos considerados chave na ecologia da polinização das espécies da tribo Rhynchosporae e concluímos que os atributos relacionados à anemofilia são plesiomórficos. Já os caracteres relacionados à entomofilia surgiram múltiplas vezes de forma independente nos quatro clados. Além disso, em uma das linhagens observou-se mudanças de um conjunto de caracteres adaptativos derivados relacionados à entomofilia. Este conjunto de dados confirma a importância de identificar e mapear caracteres morfológicos e ecológicos que permitam o entendimento de mudanças de sistema de polinização e seus efeitos históricos na evolução dos grupos. A partir deste estudo obteve-se uma visão geral sobre a biologia floral e reprodutiva em espécies de *Rhynchospora*, pode-se entender melhor o papel dos vetores de pólen, a importância da ambofilia e a história evolutiva do surgimento de caracteres entomófilos. Além disso, esta tese quebra o paradigma de que *Rhynchospora* é um gênero anemófilo, sendo possível, a partir deste estudo, classificá-lo como ambófilo.

REFERENCIAS

- ACKERMAN, J.D. Abiotic and pollen and pollination: ecological, functional, and evolutionary perspectives. **Plant Systematic and Evolution**, v. 222, p.167-185, 2000.
- ALVES, M. et al. Diversity of Cyperaceae in Brazil. **Rodriguésia**, v. 60, p. 771–782, 2009.
- BOWKER, J.E.; CRENSHAW, H.C. Electrostatic forces in wind-pollination, Part 1: measurement of the electrostatic charge on pollen. **Atmospheric Environment**, v. 41, p.1587-1595, 2007a.
- BOWKER, J.E.; CRENSHAW, H.C. Electrostatic forces in wind-pollination, Part 2: Simulations of pollen capture. **Atmospheric Environment**, v.41, p.1596-1603, 2007b.
- BUDDENHAGEN, C.E.; THOMAS, W.W.; MAST, A.R. A First Look at Diversification of Beaksedges (Tribe Rhynchosporae: Cyperaceae) in Habitat, Pollination, and Photosynthetic Features. **Memoirs New York Botanical Garden** (no prelo).
- CNIP. 2009. **Checklist das plantas do nordeste brasileiro: Angiospermae e Gymnospermae**. Disponível em: <http://www.cnip.org.br/bdpn/checklistNE.pdf>. Acessado em: 26 Abr. 2010.
- COSTA, A.C.G.; MACHADO, I.C. Flowering dynamics and pollination system of the sedge *Rhynchospora ciliata* (Vahl) Kük. (Cyperaceae): does ambophily enhance its reproductive success? **Plant Biology**, v. 14, p. 881-887, 2012.
- CRUDEN, R.W. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution**, v. 31, p. 32-46, 1977.
- CRUDEN, R.W. Pollen grains: how so many? **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, p. 143-165, 2000.

CULLEY, T.M.; WELLER, S.G.; SAKAI, A.K. The evolution of wind pollination in angiosperms. **Ecology & Evolution**, v.17, p.361-369, 2002.

DAHLGREN, R.M.T.; CLIFFORD, H.T.; YEO, P.F. **The families of the monocotyledons: structure, evolution and taxonomy**. Berlin: Springer-Verlag, 1985.

ENDRESS, P.K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge University Press, 1994.

FAEGRI, K.; PIJL, L. **The principles of pollination ecology**. 3 ed. Oxford, Pergamon Press, 1979.

FRIEDMAN, J.; BARRETT, S.C.H. A phylogenetic analysis of the evolution of wind pollination in the angiosperms. **International Journal of Plant Science**, v.169, p. 49-58, 2008.

FRIEDMAN, J. ; HARDER, L.D. Inflorescence architecture and wind pollination in six grass species. **Functional Ecology**, v. 18, p. 851-860, 2004.

GUAGLIANONE, E.R. Contribución al estudio del género *Rhynchospora* (Cyperaceae) v. sección longirostres en América austral. **Darwiniana**, v.39, p. 287–342, 2001.

LEPPIK, E.E. *Dichromena ciliata*, a noteworthy entomophilous plant among Cyperaceae. **American Journal of Botany**, v. 42, p.455- 458, 1955.

LINDER, H.P. Morphology and the evolution of wind pollination. In: OWENS, S.J.; RUDALL, P.J. (Eds). **Reproductive biology in systematics, conservation and economic botany**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1998.

LUCEÑO, M.; ALVES, M.V.; MENDES, A.P. Catálogo florístico y claves de identificación de las ciperáceas de los estados de Paraíba y Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 55, p. 67–100, 1997.

LUCERO, L.E. *et al.* Evolution and Development of the Spikelet and Flower of *Rhynchospora* (Cyperaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v.175, p.186-201, 2014.

MAGALHÃES, A.F. *et al.* Floral scent of *Eleocharis elegans* (Kunth) Roem. & Schult. (Cyperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.33, p.675-679, 2005.

MUASYA, A.M. *et al.* Suprageneric phylogeny of Cyperaceae: A combined analysis. Pp. 593–601. In: WILSON, K.; MORRISON, D. (Eds.). **Monocots: Systematics and Evolution**. Melbourne: CSIRO, 2000.

MUASYA, A.M. *et al.* An assessment of suprageneric phylogeny in Cyperaceae using *rbcl* DNA sequences. **Plant Systematics and Evolution**, v. 211, p. 257–271, 1998.

NIKLAS, K.J. The aerodynamics of wind pollination. **The Botanical Review**, v. 51, p. 328-386, 1985.

RAMOS, C.O.C.; FONSECA, R.B.S. Polinização de *Rhynchospora almensis* D. A. Sympton (Cyperaceae), no município de Palmeiras, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. p. 25-30. In: VIANA, B.F.; OLIVEIRA, F.F. (Eds.). **Biologia e ecologia da polinização**: curso de campo. Salvador: EDUFBA, 2006.

RECH, A.R. *et al.* The macroecology of animal versus wind pollination: ecological factors are more important than historical climate stability. **Plant Ecology & Diversity**, v. 9, n.3, p. 253–262, 2016.

REGAL, P.J. Pollination by wind and animals: ecology of geographic patterns. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.13, p.497-524, 1982.

THOMAS, W.W. The systematics of *Rhynchospora* section *Dichromena*. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v. 37, p. 1-116, 1984.

THOMAS, W.W.; ARAUJO, A.C ; ALVES, M.C. A preliminary molecular phylogeny of the Rhynchosporae (Cyperaceae). **The Botanical Review**, v. 75, p. 22–29, 2009.

WILLMER, P. **Pollination and floral ecology**. New Jersey: Princeton University Press, 2011.

WRAGG, P.D. ; JOHNSON, S.D. Transition from wind pollination to insect pollination in sedges: experimental evidence and functional traits. **New Phytologist**, v.191, p.1128-1140, 2011.

ANEXO – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NOS PERÍODICOS

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO ANNALS OF BOTANY

PREPARING THE ARTICLE FILE

Text should be typed using size 12 Times New Roman or Courier, double-spaced throughout and with an approx. 25 mm margin. All pages should be numbered sequentially. Each line of the text should also be numbered, with the top line of each page being line 1. The article file should be in PC-compatible Microsoft Word - file type DOC [please make sure the "Language" is "English (U.K)" via Tools → Language → Set Language]. RTF files are also acceptable. Please do not use the Windows Vista DOCX format: if you have created the text in this format, please save the files as RTF before submitting them. Please do not submit PDFs, desktop publishing files or LaTeX files. The article file should include a list of any figure legends but exclude any figures themselves – these should be submitted separately, with each figure in a separate file. Tables should be included at the end of the article file, in a Word format and not embedded as an image/picture. For more details see below under PREPARING TABLE and FIGURE FILES, SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES AND VIDEO FILES .

It is NOT journal style to have footnotes within articles. Any such notes must be incorporated into the main text, for example within brackets or as a separate paragraph.

The first page should state the type of article (e.g. Original Article, Technical Article) and provide a concise and informative full title followed by the names of all authors. Where necessary, each name should be followed by an identifying superscript number (1, 2, 3 etc.) associated with the appropriate institutional address to be entered further down the page. For papers with more than one author, the corresponding author's name should be followed by a superscript asterisk*. The institutional address(es) of each author should be listed next, each address being preceded by the relevant superscript number where appropriate. A running title of not more than 75 characters, including spaces, should also be provided, followed by the e-mail address of the corresponding author. Please follow the layout used for the first page of papers published in Annals of Botany.

As normas completas para publicação podem ser acessadas em:
[https://academic.oup.com/aob/pages/General Instructions](https://academic.oup.com/aob/pages/General_Instructions)

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO PLANT SPECIES BIOLOGY

PREPARATION OF THE MANUSCRIPT

The manuscript must be doubled-spaced, on one side only of A4 paper. The top, bottom and side margins should be 30 mm. All pages should be numbered consecutively in the top right-hand corner, beginning with the title page. Indent new paragraphs. Turn the hyphenation option off, including only those hyphens that are essential to the meaning.

Covering letter

Papers are accepted for publication in the Journal on the understanding that the content has not been published or submitted for publication elsewhere. This must be stated in the covering letter. Authors should declare any financial support or relationships that may pose conflict of interest.

Style

Style should conform to the Council of Biology Editors Style Manual 5th edn (CBE Publications, 1994). Please follow the format in the current issue of the Journal. The Journal uses US spelling and authors should therefore follow the latest edition of the Merriam-Webster's Collegiate Dictionary.

All measurements must be given in SI units as outlined in the latest edition of Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors (Royal Society of Medicine Press, London).

Abbreviations should be used sparingly and only where they ease the reader's task by reducing repetition of long, technical terms. Initially use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation. Upon its first use in the title, abstract and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species and authority) in parentheses. Common names of organisms, if used, must be accompanied by the correct scientific name on every mention. At the first mention of a chemical substance, give the generic name only. Trade names should not be used.

As normas completas para publicação podem ser acessadas em :
<[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1442-1984/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1442-1984/homepage/ForAuthors.html)>

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PLANT ECOLOGY

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

PORTABLE PEER-REVIEW

To limit multiple reviews of the same manuscript and therefore to decrease the workload on the scientific reviewer community, Plant Ecology supports portable peer-review. If your manuscript has already been through peer-review and you feel that these reports would help our Editorial Board reach a final decision on your manuscript more quickly, we would welcome the submission of these documents as an attachment along with your cover letter. Previous reviews must be submitted as an unaltered copy of the original email received by you from the journal. Please discuss how you have responded to these previous reviewer's comments in your cover letter as a point-for-point list indicating the changes you have made to the submitted manuscript.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

As normas completas para publicação podem ser acessadas em:

http://www.springer.com/life+sciences/ecology/journal/11258?detailsPage=pltc_i_10603

29>

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO ECOLOGICAL RESEARCH

GENERAL INFORMATION

Ecological Research is the official English-language journal of the Ecological Society of Japan and publishes original papers on all aspects of ecology, in both aquatic and terrestrial ecosystems. Manuscripts published in this journal must fundamentally advance and/or change our understanding of ecological principles. Purely descriptive papers and those merely confirming or extending results of previous work will not be considered. We publish original articles, current topics in ecology, special features, technical reports, notes and comments, data papers, and forum papers. The journal is introducing "Biodiversity in Asia" as a new article type.

The articles in "Current topics in ecology" review recent advances in topical areas of ecology. "Special features" are collections of research articles and reviews organized by the guest editors. "Technical reports" propose the development of new methods with the potential to advance of ecological research. "Notes and comments" report new significant ecological findings that do not warrant standard full-length manuscripts. "Data papers" are intended to develop ecological research by electronically archiving excellent research data accompanying metadata of any ecological process. The "Forum" section is reserved for discussing the future work of ecology and should be written by authors authorized by the society.

The acceptance criteria for all papers are quality and originality of research and its significance to our readership. Final acceptance or rejection rests with the Editorial Board.

Of the papers published in each volume of Ecological Research, approximately five will be chosen by members of the Editorial Board as "Excellent Papers" every year.

Manuscript Submission

Manuscripts should be written so that they are intelligible to the professional reader who is not a specialist in the particular field.

As normas completas para publicação podem ser acessadas em:
https://www.springer.com/life+sciences/ecology/journal/11284?detailsPage=pltc_i_25898

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO BOTANICAL JOURNAL OF THE LINNEAN SOCIETY

Instructions for Authors

The Linnean Society publishes four periodicals: the Biological, Botanical and Zoological Journals, and The Linnean, the Society's newsletter and proceedings.

The Botanical Journal of the Linnean Society publishes original papers on systematic and evolutionary botany and comparative studies of both living and fossil plants. Review papers are also welcomed which integrate fields such as cytology, morphogenesis, palynology and phytochemistry into a taxonomic framework. The journal will only publish new taxa in exceptional circumstances as part of larger monographic or phylogenetic revisions.

Submissions to the Botanical Journal are made on-line using ScholarOne Manuscripts. To submit to the Journal go to <http://mc.manuscriptcentral.com/botjls>. If this is the first time you have used the system you will be asked to register by clicking on 'create an account'. Full instructions on making your submission are provided. You should receive an acknowledgement within a few minutes. Thereafter, the system will keep you informed of the process of your submission through refereeing, any revisions that are required, and a final decision.

Manuscripts submitted by other methods will not be considered.

Conflict of Interest

The Botanical Journal of the Linnean Society requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

As normas completass para publicação podem ser acessadas em:
[<http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1095-8339/homepage/ForAuthors.html>](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1095-8339/homepage/ForAuthors.html)